

Oznaka poročila: ARRS-CRP-ZP-2019/11



ZAKLJUČNO POROČILO O REZULTATIH CILJNEGA RAZISKOVALNEGA PROJEKTA

A. PODATKI O RAZISKOVALNEM PROJEKTU

1. Osnovni podatki o raziskovalnem projektu

Šifra	V4-1606
Naslov	Izvor in širjenje odpornih bakterij preko živil živalskega izvora
Vodja	12682 Irena Zdovc
Naziv težišča v okviru CRP	1.3.1 Izvor in širjenje večkratno odpornih bakterij preko živil živalskega izvora
Obseg učinkovitih ur raziskovalnega dela	260
Cenovna kategorija	C
Obdobje trajanja	10.2016 - 09.2018
Nosilna raziskovalna organizacija	510 Univerza v Ljubljani 406 Univerza v Ljubljani, Veterinarska fakulteta
Raziskovalne organizacije - soizvajalke	
Raziskovalno področje po šifrantu ARRS	4 BIOTEHNIKA 4.04 Veterina 4.04.05 Zdravstveno varstvo živil živalskega izvora
Družbeno-ekonomski cilj	07. Zdravje
Raziskovalno področje po šifrantu FORD	4 Kmetijske vede in veterina 4.03 Veterina

2. Sofinancerji

	Sofinancerji		
1.	Naziv	Ministrstvo za kmetijstvo in okolje	
	Naslov	Dunajska cesta 22, 1000 Ljubljana	

B. REZULTATI IN DOSEŽKI RAZISKOVALNEGA PROJEKTA

3. Povzetek raziskovalnega projekta¹

SLO

Odpornost bakterij proti antibiotikom je v veterinarski medicini postala velik problem tako pri ekonomskih kot tudi pri ljubiteljskih vrstah živali. Pri živalih, ki so namenjene za prehrano ljudi, imajo velik zoonotični pomen proti meticilinu odporne bakterije *Staphylococcus aureus* (Livestock-Associated ali LA-MRSA), enterobakterije, ki izločajo betalaktamaze z razširjenim spektrom delovanja (ESBL) in proti karbapenemom ter proti kolistinu odporne bakterije. V naši raziskavi smo pregledovali vzorce v objektih za rejo gospodarskih živali v zadnjih dneh reje in ob klanju živali. Vse vzorce smo preiskali po laboratorijskih protokolih za usmerjeno izolacijo proti meticilinu odpornih bakterij *S. aureus* (MRSA), proti vankomicinu odpornih enterokokov (VRE) in proti aminoglikozidom v visokih koncentracijah odpornih enterokokov (HLAR). Med enterobakterijami smo preiskovali prisotnost *E. coli* z razširjenim spektrom betalaktamaz (ESBL/AmpC), *E. coli* s karbapenemazami in z odpornostjo proti kolistinu.

Preiskali smo različne okoljske vzorce s farme za purane in kasneje iz klavnice, kamor so šle živali v zakol. Na farmi smo izolirali le *E. coli* ESBL na dveh mestih, kasneje na klavnici pa *E. coli* AmpC na treh različnih mestih. Rezultati preiskav na ostale odporne bakterije so bili negativni, zato menimo, da reje puranov niso zelo problematične, potrebna pa je pazljivost, da ne pride do kontaminacije z *E. coli* na klavnici.

Za ugotavljanje sledenja morebitne kontaminacije živali med procesom klanja smo pregledali brise piščancev brojlerjev in okolja na perutninski klavnici, kjer so v enem dnevu opravili zaporedno klanje živali s treh različnih farm. Na ta način smo želeli ugotoviti, kakšna je na klavnici verjetnost kontaminacije perutninskega mesa z odpornimi bakterijami, ki so ostale na liniji klanja po predhodnem klanju. Ugotovili smo, da je velika verjetnost prenosa *E. coli* AmpC iz klavniškega okolja na trupe piščancev, vendar zaradi velike raznolikosti izolatov tega nismo mogli neposredno dokazati. Iz vzorcev perutnine je bil doslej pridobljen tudi izolat MRSA in dva identična izolata VRE.

Na prašičarski farmi smo ugotovili prisotnost MRSA iz večine vzorcev, *E. coli* ESBL pa iz vzorcev, povezanih s fekalno kontaminacijo. Identične izolate smo ugotovili tudi iz vzorcev, ki smo jih izolirali kasneje na klavnici, zato sklepamo, da večina odpornih bakterij v klavnico pride z živalmi ob vsakokratnem klanju. Možen pa je tudi prenos bakterij pri obdelavi klavnih trupov oz. ob neupoštevanju vseh predpisanih postopkov med klanjem.

Verjetnost prenosa odpornih bakterij med različnimi vrstami živali smo preučevali na posestvu z mešano populacijo in ugotovili smo prvi primer MRSA pri teletih v Sloveniji, pri prašičih pa prvi primer kolonizacije z bakterijo MRSA, pri kateri je bil za odpornost odgovoren gen *mecC*.

Vsi omenjeni problemi imajo lahko zelo velik vpliv na zdravje ljudi, zato jih je mogoče reševati le z odgovornim in usklajenim delom vseh vpletenih strok.

ANG

The antimicrobial resistance has become a major problem in the veterinary medicine, both in economic and in pet animals. In the food-producing animals, a great zoonotic impact has been shown by the methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (Livestock-Associated, LA-MRSA), enterobacteria that are producing the extended spectrum beta-lactamases (ESBLs) and bacteria resistant to carbapenems and colistin. In the scope of our study, samples from the animal breeding facilities in the last days of rearing were inspected in addition to the samples from the slaughtering. All the samples were tested according to laboratory protocols for the isolation of methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA), vancomycin-resistant enterococci (VRE) and high-level aminoglycoside-resistant enterococci (HLAR). Among the enterobacteria, the presence of *E. coli* ESBL/AmpC, *E. coli* with carbapenemases and the colistin resistance were inspected.

The various environmental samples from the turkey farm and later from the affiliated slaughterhouse were inspected. At the farm, only *E. coli* ESBL was isolated from two sampling sites, and later in the slaughterhouse *E. coli* AmpC from three different locations. The results of the tests for other resistant bacteria were negative; therefore, it can be concluded that the turkey breeding farms are not very problematic, but cross contamination with *E. coli* should be avoided.

To find a possible contamination during the slaughtering, samples were collected from broilers and from surfaces where slaughtering of animals from three different farms was performed in the same day. In this manner, we aimed to determine the probability of contamination of poultry meat with resistant bacteria that remained on the slaughter line after the previous slaughtering. There is a high probability of transmitting *E. coli* AmpC from the abattoir environment to chicken carcasses, but due to the high variety of isolates this could not be directly confirmed. In addition, one MRSA isolate and two identical VRE isolates were also obtained from the poultry samples.

At the pig farm, the presence of MRSA was detected in most of the samples, and also *E. coli* ESBL from samples associated with faecal contamination. Identical isolates were found from slaughterhouse samples, thus it can be concluded that most of the resistant bacteria are probably introduced from the animals at each slaughtering. Bacterial contamination during the manipulation of pig carcasses or due to failing the compliance with all prescribed slaughtering procedures is also possible.

Transmission of resistant bacteria among different animal species was studied at a mixed-animal farm. Surprisingly, the first case of MRSA in calves in Slovenia was discovered, and a first case in pigs of colonization with MRSA harbouring the *mecC* resistance gene. All these problems can have a tremendous impact on the human health, thus they can be solved only with a responsible and coordinated work of all the involved professions.

4. Poročilo o realizaciji predloženega programa dela oz. ciljev raziskovalnega projekta²

Na podlagi rezultatov naše raziskave menimo, da so možnosti za prenos odpornih bakterij prisotne na veliko mestih v času reje, transporta in klavnice, obstajajo pa določene razlike glede verjetnosti prenosa posameznih vrst odpornih bakterij.

1. Opredelitev kritičnih mest, kjer odporne bakterije vstopajo v prehransko verigo

Prva kritična točka so živali, ki pridejo na klavnico iz rej z zelo različno bakterijsko mikrobioto, ki smo jo predhodno preverili vzorčenjem na farmi, tik pred predvidenim klanjem. Po klanju smo iz črevesne vsebine izolirali *E. coli* AmpC, enako tudi na nožu za evisceracijo in trupu pred hlajenjem. Preverili smo tudi možnost kontaminacije mesa preko delavca, ki najprej sodeluje pri zakolu in nato pri obdelavi mesa. Mesarji imajo imeti na vsakem delovnem mestu sterilizator z vročo vodo za razkuževanje noža, vendar vode občasno zmanjka ali ima prenizko temperaturo. V klavnici za prašiče smo v umazani bazenski vodi za garanje izolirali *E. coli* ESBL, vendar so brisi trupov negativni, kar je zasluga boljše, vertikalne metode garanja, kjer se umazana voda izteka neposredno v odpadno vodo.

MRSA smo ugotovili v večini vzorcev v rejah prašičev, na transportnem kamionu in na klavnici v vseh nosnih brisih zaklanih prašičev, na brisih trupov po omamljanju in na trupih pred hlajenjem. Vsi izolati so imeli rezistotip, značilen za LA MRSA, pripadali pa so tipu *spa* t011.

V rej puranov in iz vzorcev na perutninski klavnici, MRSA ni bil ugotovljen v nobenem primeru. Vendar pa je bil MRSA (*spa* tip t011) izoliran na perutninski klavnici (voda iz skubilnika), kjer so bili zaporedno klani brojlerji iz treh različnih rej. Na posestvu z mešano populacijo živali (govedo, konji, koze, prašiči, perutnina) je bil MRSA ugotovljen pri teletih in svinjah. Ker smo pri svinjah ugotovili izolat, ki je imel rezistenčni gen *mecC*, nismo mogli potrditi medsebojne povezave.

Enterokoki so bili izolirani iz večine vseh vzorcev, ne glede na živalsko vrsto ali mesto vzorčenja. Glede odpornosti proti vankomicinu je situacija zelo dobra, ker smo odporne seve izolirali samo iz dveh vzorcev vode v parilniku na perutninski klavnici, kjer je šlo očitno za klavniško kontaminacijo. Oba izolata sta bila odporna proti vankomicinu in teikoplaninu zaradi rezistentnega gena *vanA*. Med ostalimi enterokoki so bili povsod izolirani *E. hirae*, *E. faecium* in *E. faecalis*, ki kažejo različno stopnjo odpornosti proti antibiotikom.

***E. coli* z ESBL** smo v rej puranov ugotovili le v hlevskem prahu na ventilatorjih in okenskih policah. Oba izolata sta imela identičen rezistotip, ki je bil fenotipsko odporen še proti drugim skupinam antibiotikov (proti trimetoprimu in trimetoprim/sulfametoksazolu, tetraciklinu in fluorokinolonu). Na klavnici so bili odporni sevi *E. coli* izolirani le iz brisov kletk s purani, vsebine črevesa in s trupov pred hlajenjem. Vsi klavniški izolati so imeli identičen rezistotip, *E. coli* AmpC, in so torej pripadali drugačnemu tipu kot farmska izolata. Na klavnici za perutnino po zaporednem klanju brojlerjev iz treh različnih rej je bilo pregledanih 19 skupin vzorcev. Vzorci prve farne pred zakolom so bili negativni na ESBL/AmpC, vsi naslednji vzorci pa pozitivni. Vzorci vseh treh farm so bili pozitivni na liniji klanja po evisceraciji, trupi pred hlajenjem in po hlajenju. Vsi izolati so imeli identičen rezistotip (*E. coli* AmpC), zato bi lahko sklepali, da je šlo za kontaminacijo na klavni liniji.

V rej prašičev smo iz večine vzorcev okolja izolirali *E. coli* ESBL/AmpC. z identičnim rezistotipom. Tudi na klavnici smo *E. coli* ESBL izolirali iz večine okolja, ne pa na brisih trupov prašičev po omamljanju in po evisceraciji ali brisih nožev veterinarjev. Negativni so bili vsi brisi trupov prašičev pred hlajenjem. Na posestvu z mešano populacijo živali *E. coli* z ESBL AmpC ni bil ugotovljen.

2. Tipizacija izoliranih sevov in proučitev, ali so živalski sevi bakterij že prisotni v populaciji ljudi v Sloveniji in na kakšen način prihaja do morebitnih okužb.

V Sloveniji trenutno tipizacija odpornih bakterij ni del rutinskega diagnostičnega postopka (ne v humani in ne v veterinarski medicini), ker so preiskave zelo drage in nimajo neposrednega pomena za zdravljenje ljudi in živali. Izvajajo se samo v primerih izbruhov, ko je potrebno epidemiološko sledenje in ugotavljanje vira okužb.

Vzorci prašičev v začetni fazi klanja so bili pozitivni na prisotnost izolatov MRSA, kasneje smo izolate MRSA izolirali iz brisov trupa pred hlajenjem. Take rezultate pripisujemo naknadni kontaminaciji. Trupi prašičev se po obdelavi prežagajo na polovico. Žaga potuje tudi preko nosnih pretinov rilca in se tako kontaminira z bakterijami MRSA. Kasneje pa se trupi, ko potujejo po liniji, med seboj dotikajo, tako z zunanje kot tudi notranje strani. Druga možnost pa je, da temperatura vode za garanje trupov ne uniči vseh bakterij MRSA. Rezultati tipizacij izolatov so podani v prejšnjem poglavju 1, skupaj z rezultati antibiogramov in v poglavju 4.

3. Proučevanje ali je kontaminirana hrana lahko nosilec širjenja črevesnih in zunajčrevesnih okužb pri ljudeh.

Pregledali smo vzorce mesa prašičev (klavne polovice) in brojlerjev (cele trupe) v končni fazi,

ko so že pripravljene za prodajo oz. za neposredno prehrano ljudi. Po pričakovanjih smo *E. coli* ESBL/AmpC dokazali na trupih brojlerjev in MRSA na klavnih polovicah prašičev.

Podatki o vlogi živali, kot neposrednemu viru okužb z odpornimi enterobakterijami, so zaenkrat še mnogo manj zanesljivi, kot podatki o prenosu MRSA. Tudi v primeru *E. coli* imamo v Sloveniji večji delež prebivalcev, ki so bolniki ali nosilci *E. coli* ESBL/AmpC, vendar neposredni prenos doslej še ni bil zanesljivo dokazan.

4. Molekularna tipizacija večkratno odpornih enterobakterij (predvsem tipa ESBL/AmpC) oz. ugotavljanje njihovih genov za odpornost in patogenost.

V našem projektu smo z molekularnimi metodami izolirali gene za encime ESBL iz skupine CTX-M1 in CTX-M2, AmpC in encime ESBL iz skupine TEM. Tako smo pri puranih, prašičih in teletih izolirali gene za encime iz skupine CTX-M1, pri brojlerjih pa iz skupine CTX-M2. Po literaturi so gene za encime iz skupine CTX-M2 že izolirali iz slovenskih brojlerjev (Ambrožič Avguštin in sod., 2012). *E. coli* AmpC smo izolirali samo pri perutni, in sicer v višjem odstotku pri brojlerjih kot puranih. Vsi izolati *E. coli* AmpC pa so bili iz vzorcev, odvzetih na klavnici, kar nakazuje, da izolati AmpC krožijo v klavnicih za perutnino in to okolje predstavlja tveganje za prenos odpornih sevov na hrano. Gen za encim iz skupine TEM smo izolirali pri vseh ESBL pozitivnih vzorcih pri prašičih na klavnici in v višjem odstotku tudi pri brojlerjih. Brojlerji imajo, najverjetneje zaradi sistema reje, bolj pogosto *E. coli* ESBL iz skupine CTX-M2.

Tipizacija odpornih bakterij je povezana z zelo velikimi materialnimi stroški, zato še ni del rutinskega diagnostičnega postopka. Za analizo stanja odpornosti ni zadostno le spremljanje fenotipskih značilnosti izolatov, kar nam omogoča izdelava antibiograma po mikrodilucijski metodi. S pomočjo molekularnih metod smo pripomogli tudi k razumevanju prevalence in mehanizmov odpornosti bakterij proti izbranim protimikrobnim snovem. Na osnovi tega smo lahko ovrednotili tveganje za razvoj navzkrižne odpornosti proti različnim protimikrobnim zdravilom in tudi drugim, nesorodnim protimikrobnim snovem.

Pojav odpornosti proti betalaktamskim antibiotikom so odkrili še pred začetkom klinične uporabe prvega betalaktamskega antibiotika penicilina (Bradford, 2001). Leta 1963 je bila prvič izolirana proti ampicilinu odporna *E. coli*, odpornost ji je omogočil encim betalaktamaza TEM-1, ki je kodiran na plazmidu. Tako se je odpornost razširila v številne vrste družine Enterobacteriaceae in nekatere druge bakterije. Produkcija betalaktamaz tipa AmpC pa ni samo plazmidno kodirana, ampak je lahko posledica kromosomske hiperprodukcije zaradi mutacije v promotorski/supresorski regiji.

Encimi iz skupine CTX-M pa predstavljajo v številnih državah najpogostejši vzrok odpornosti enterobakterij proti cefalosporinom. Primarni gostitelj je bakterija vrste *E. coli* (Woodford, 2010). V Sloveniji iz živil živalskega izvora najpogosteje izoliramo CTX-M1, v nižjem odstotku tudi CTX-M2 in CTX-M9 (Ambrožič Avguštin in sod., 2012; Križman in sod., 2017).

5. Ugotavljanje morebitne prisotnosti enterobakterij, ki izločajo karbapenemaze in njihova molekularna tipizacija.

Kljub zelo velikemu številu pregledanih vzorcev, nismo v nobenem primeru ugotovili prisotnosti bakterij *E. coli* s sposobnostjo izločanja karbapenemaz, kar kaže na dobro stanje na tem področju v populaciji slovenskih rejnih živali. Zaradi odsotnosti izolatov molekularna tipizacija ni bila mogoča, vendar pa smo v okviru projekta vzpostavili sistem molekularne tipizacije proti karbapenemom odpornih enterobakterij. Enterobakterije, ki izločajo karbapenemaze, predstavljajo hud problem v humani medicini, kjer karbapenemi predstavljajo zelo pomembno skupino rezervnih antibiotikov. V Sloveniji že nekaj let izvajamo monitoring na različnih vzorcih živali (tudi na mesu) in doslej še nismo izolirali seva *E. coli*, ki bi izločal karbapenemaze.

6. Priprava sheme za redni monitoring ugotavljanja večkratno odpornih bakterij pri živalih in v živilih ter uvedbo vseh potrebnih metod za molekularno tipizacijo.

Diagnostični protokoli, ki so bili uporabljeni za preiskave vzorcev v okviru našega projekta so sodobni in popolnoma usklajeni z evropskimi, zato je na tem področju stvar popolnoma urejena. Uvedene metode pa se izjemno hitro dopolnjujejo in modernizirajo, zato je potrebno stalno slediti novim trendom. Osnova za ugotavljanje odpornih bakterij so usmerjene izolacijske metode za posamezne vrste bakterij, za fenotipsko potrditev pa še vedno mikrodilucijska metoda, ki je natančna in informativna, poleg tega pa je tudi priporočena s strani centralnih referenčnih laboratorijev.

V primerih izbruhov ali ugotavljanja vira okužb (predvsem kadar bo utemeljen sum, da je vir okužbe hrana) pa bodo molekularne tipizacijske metode nepogrešljive.

Zaradi potrebnih specialnih znanj in zelo drage opreme pričakujemo, da bo molekularna diagnostika za tipizacijo posebno odpornih bakterij ostala omejena le na specializirane laboratorije, predvsem na Nacionalni referenčni laboratorij za odpornost proti protimikrobnim zdravilom. Poenotenje metodologije bo omogočilo popolno primerljivost rezultatov, tako znotraj Slovenije kot tudi z državami EU.

7. Priprava podlag za smernice za omejevanje širjenja večkratno odpornih bakterij preko živil živalskega izvora in njihova predstavitev za zainteresirano javnost

Ugotovili smo, da so različne živalske vrste imele odporne bakterije iz različnih skupin, zato smo pri pripravi smernic uporabili različen pristop. Za perutnino in perutninske klavnice so bolj prevalentne bakterije z encimi ESBL/AmpC, medtem ko so pri prašičih bolj prevalentni izolati MRSA. V obeh primerih so rezultati dobra podlaga za smernice za nosilce živilske dejavnosti (klavnice). V raziskavi smo dobili podatke, katera so tista kritična mesta, kjer lahko bakterija prehaja iz živali na meso. Taka kritična točka je evisceracija, ker smo enak

rezistotip bakterij izolirali iz črevesja in brisov trupov pred hlajenjem. Našli smo tudi kritična mesta, ki so že sedaj podvržena kontroli, tako s strani uradnih veterinarjev kot tudi samih nosilcev živilske dejavnosti, pa smo prav tako izolirali bakterije, ki so odgovorne za kvarjenje mesa. Brisi so bili odvzeti med delovnim procesom, a so bili v istem času odvzeti tudi brisi nožev uradnega veterinarja in so bili negativni. V naši raziskavi pa smo dokazali, da so nekateri tehnološki postopki boljši od drugih in lahko damo smernice za gradnje novih klavnic v prihodnosti.

5. Ocena stopnje realizacije programa dela na raziskovalnem projektu in zastavljenih raziskovalnih ciljev³

V okviru projekta smo pridobili številne nove informacije in znanstvena spoznanja o pojavnosti, vrsti in lastnostih izolatov bakterij s posebnimi oblikami odpornosti, pridobljenimi iz živali, farmskega okolja in okolja klavniške industrije. Pri tem so sodelovali raziskovalci iz vseh sodelujočih inštitutov in se ob tem dodatno izpopolnjevali in usposabljali. S posodobitvijo diagnostičnih postopkov lahko ponudimo širši spekter preiskav za izolacijo odpornih bakterij (npr. izolacija proti kolistinu odpornih enterobakterij z usmerjeno preiskavo na selektivnih gojiščih), testiranja občutljivosti oz. odpornosti ter molekularnih metod (npr. dokazovanje genov za odpornost proti karpapenemom). Izboljšanje obstoječega informacijskega sistema/podatkovnih baz je bilo posebno očitno pri oblikovanju skupne arhivske zbirke posebno odpornih bakterij in postavitvi širše baze podatkov. Z rezultati preiskav smo seznanili partnerje na projektu in stranke, od katerih smo pridobili vzorce oz. izolate odpornih bakterij, širši strokovni javnosti in pristojnim upravnim službam. Podatki so bili posredovani v obliki seminarjev, permanentnih izobraževanj, strokovnih posvetovanj in objav v domači in tuji strokovni literaturi in javni predstavitvi ob zaključku projekta. Pregledovali smo veliko različnih vzorcev, ki so se razlikovali tako po vrsti, kot tudi velikosti, konsistenci in drugih lastnostih, zato je bilo potrebno nekatere standardne metode delno modificirati oz. prilagoditi vrsti in velikosti vzorca. Zaradi tega so bile posredno ali neposredno vpeljane ali izboljšane posamezne diagnostične metode. Prilagodili smo postopek za izolacijo odpornih bakterij iz vode z modificiranim postopkom filtracije in postopek za izolacijo odpornih bakterij iz zraka. Na podlagi ocene stanja glede pogostnosti pojavljanja odpornih bakterij v izbranih vzorcih smo svetovali pri izboljšanju tehnologij v smeri večje varnosti živil. Svetovanja smo izvajali, kadar smo obravnavali večje povezane problematike, največkrat pri svetovanju delavcem in veterinarjem kako ravnati na farmah prašičev, kjer je ugotovljena kolonizacija živali z MRSA. Na podlagi tipizacije z molekularnimi metodami smo pomagali pri sledenju virov okužb in predlagali ukrepe za preprečevanje nastanka novih okužb. V okviru dodiplomskega izobraževanja za študente veterinarstva smo v okviru predmeta Mikrobiologija in parazitologija povečali število ur v zvezi s preudarno rabo antibiotikov in spremljanja odpornosti bakterij, kar se kaže v večji osveščenosti novih generacij veterinarjev. Rezultati projekta kažejo smernice, kako zmanjšati kontaminiranost živil živalskega izvora z odpornimi bakterijami in povečati osveščenost oz. znanje potrošnikov v smeri varnejše priprave hrane, kar bo imelo vpliv na varovanje zdravja in razvoj zdravstvenega varstva.

6. Spremembe programa dela raziskovalnega projekta oziroma spremembe sestave projektne skupine⁴

Cilji projekta so bili doseženi v celoti, v posameznih delih pa celo preseženi. V načrtu je bilo proučevanje prenosa odpornih bakterij s perutninske farme na klavnico za belo meso ter s prašičje farme na klavnico za rdeče meso. V zadnjem delu projekta pa smo dobili priložnost odvzema vzorcev ob klanju telet, pri katerih smo nepričakovano izolirali MRSA, zato smo se odločili še za vzorčenje cele kmetije, s katere so teleta izvirala. Naša odločitev se je izkazala za zelo utemeljeno, ker smo na ta način pridobili zelo zanimive podatke o širjenju odpornih bakterij med živalmi različnih vrst na istem posestvu.

Cilji projekta se niso spremenili, zaradi novih znanstvenih odkritij pa je bila potrebna dopolnitev predvidenega diagnostičnega postopka. Takoj po prijavi projekta (v začetku oktobra 2016) smo iz Evropskega referenčnega laboratorija za odpornost bakterij proti protimikrobnim zdravilom (EURL AMR) prejeli informacijo o odkritju novega gena za odpornost proti kolistinu in posodobljen protokol za dokaz genov odpornosti. Protokol poleg znanega gena *mcr1* predvideva tudi ugotavljanje novega gena *mcr2* z metodo multiplex PCR. Za omenjeno metodo smo prejeli tudi referenčne seve, ki smo jih uporabili za validacijo metode, ki je bila opravljena leta 2017. V času trajanja projekta se je zaradi novih odkritij omenjeni protokol posodobil še enkrat, vendar zaradi odsotnosti proti kolistinu odpornih bakterij nova validacija ni bila potrebna.

V obdobju poročanja ni bilo izražene nobene potrebe po spremembi sestave projektne

skupine.

7. Najpomembnejši dosežki projektne skupine na raziskovalnem področju⁵

Dosežek			
1.	COBISS ID	4178810	Vir: COBISS.SI
	Naslov	SLO	Vzorci občutljivosti za antibiotike izolatov <i>Clostridium difficile</i> izoliranih na družinskih mlečnih kmetijah
		ANG	Antimicrobial susceptibility patterns of <i>Clostridium difficile</i> isolates from family dairy farms
	Opis	SLO	Pomemben dejavnik tveganja za razvoj okužbe s <i>Clostridium difficile</i> (CDI) pri ljudeh in živalih je povezan z uporabo protimikrobnih zdravil. Pogosto so domnevali, da so lahko domače živali vir <i>C. difficile</i> (CD) za humane infekcije. Družinske mlečne kmetije so v EU prevladujoča oblika kmetij. V študiji smo z mikrodilucijsko metodo testirali protimikrobno odpornost 159 izolatov CD iz 20 družinskih kmetij za proizvodnjo mleka. Za testiranje smo izbrali 19 protimikrobnih agensov. Agensi, ki se uporabljajo za zdravljenje CDI pri ljudeh (metronidazol, vankomicin, fusidna kislina, tigeciklin, linezolid), so zavirali in vitro rast CD. Večina izolatov CD je bila odporna na eritromicin (93,1%), daptomicin (69,2%) in klindamicin (46,5%). Visoko stopnjo večkratne odpornosti smo našli pri ribotipu CD 012 (n=5; 100%), nekaterih CD SLO 060 (n=4; 25%) in enemu CD 033 (n=1; 1,1%), ki izkazujejo nizko prevalenco (10/159; 6,3%). Visoka stopnja večkratne odpornosti je bila povezana z ribotipi in ne z izvorom CD. Nizka prevalenca omenjenih ribotipov kaže, da so družinske kmetije za proizvodnjo mleka malo verjeten vir CD z večkratno odpornostjo na protimikrobna zdravila.
		ANG	A significant risk factor for developing <i>Clostridium difficile</i> infection (CDI) in humans and animals is associated with the antimicrobial use. It has often been hypothesized that farm animals could be the source for human infection with <i>C. difficile</i> (CD). In EU, family-run dairy farms are the predominant farming model. In the present study, a total of 159 CD isolates from 20 family dairy farms were tested with a customized broth microdilution plate for their antimicrobial resistance against 17 selected antimicrobials. Antimicrobials which are used for the treatment of CDI in humans (metronidazole, vancomycin, fusidic acid, tigecycline, linezolid) inhibited in vitro growth of CD. Most CD isolates were resistant to erythromycin (93.1%), daptomycin (69.2%) and clindamycin (46.5%). A high multiple-resistance was found in CD ribotype 012 (n=5; 100%), some CD SLO 060 (n=4; 25%) and one CD 033 (n=1; 1.1%), showing low prevalence (10/159; 6.3%). The high multiple-resistance was associated with ribotypes and not with the origin of CD. The low prevalence of these ribotypes indicates that family-run dairy farms are an unlikely source of CD with multiple-resistance to antimicrobials.
	Objavljeno v	Blackwell; Zoonoses and public health; 2017; Vol. 64, no. 3; str. 213-221; Impact Factor: 2.688; Srednja vrednost revije / Medium Category Impact Factor: 1.119; A': 1; WoS: NN, ZC; Avtorji / Authors: Bandelj Petra, Golob Majda, Ocepek Matjaž, Zdovc Irena, Vengušt Modest	
	Tipologija	1.01 Izvirni znanstveni članek	
2.	COBISS ID	4552314	Vir: COBISS.SI
	Naslov	SLO	Prisotnost in distribucija bakterij <i>Escherichia coli</i> , ki proizvajajo razširjeni spekter in AmpC beta-laktamaze na perutninskih kmetijah v Sloveniji
		ANG	Presence and distribution of extended-spectrum and AmpC beta-lactamases-producing <i>Escherichia coli</i> on poultry farms in Slovenia
			Namen študije je bil raziskati prisotnost, porazdelitev in dinamiko bakterij <i>Escherichia coli</i> , ki proizvajajo razširjeni spekter beta-laktamaz (ESBL) in plazmidno kodiranih AmpC beta-laktamaz (AmpC) pri perutnini za

Dosežek		
Opis	SLO	proizvodnjo mesa in v njihovem okolju. V longitudinalno študijo so bile vključene tri jate rejnih pitovnih piščancev, štiri jate pitovnih piščancev, ki so izvirale iz teh rej, ter štiri jate puranov za proizvodnjo mesa. Skupno smo testirali 349 vzorcev. Vsi okoljski vzorci, zbrani pred namestitvijo perutnine na kmetije, so bili negativni na ESBL in E. coli, ki proizvaja AmpC. V opazovanem obdobju pa so E. coli, ki proizvaja ESBL, odkrili v 41/186 vzorcih (22,0%), izolate, ki proizvajajo AmpC, pa v 10,8% vzorcev. Odporni sevi so večinoma pripadali E. coli filogenetski skupini A1 (36,2%), sledile pa so D1 (24,1%), B1 (22,4%) in D2 (10,3%). Edini odkriti geni so bili blaSHV-12, blaCMY-2 in blaCTX-M. Nismo opazili nobenih značilnih razlik glede stopnje pojavljanja odpornih sevov v blatu (18,8%), vzorcih zraka (31,4%) ali organih mrtvih ptic (20,7%). To kaže, da se vzorci zraka lahko uspešno uporabljajo kot indikator za identifikacijo pozitivnih jat, da bi preprečili ali zmanjšali navzkrižne kontaminacije v klavnicah.
	ANG	The purpose of the study was to investigate the presence, distribution and dynamics of extended-spectrum beta-lactamases (ESBL) and plasmid-mediated AmpC beta-lactamases (AmpC) producing Escherichia coli in meat-type poultry and their environment. Three broiler breeder flocks, four broiler flocks originating from these breeders, and four meat-type turkey flocks were included in a longitudinal study. A total of 349 samples were tested. All environmental samples collected before placement of birds on the farms were negative for ESBL and AmpC-producing E. coli. However, during the observation period, the ESBL-producing E. coli were detected in 41/186 samples (22.0%), while AmpC-producing isolates were identified in 10.8% of samples. The resistant strains predominantly belonged to E. coli phylogenetic group A1 (36.2%), followed by D1 (24.1%), B1 (22.4%) and D2 (10.3%). The only genes detected were blaSHV-12, blaCMY-2 and blaCTX-M. No significant differences were observed in the rates of detection of resistant strains in feces (18.8%), air samples (31.4%) or organs of dead birds (20.7%), which suggested that air samples can be successfully used as an indicator for the identification of positive flocks in order to prevent or reduce cross contaminations in the slaughter houses.
Objavljeno v		Oxford University Press; The Journal of Applied Poultry Research; 2018; Vol. , no.; str. 1-10; Impact Factor: 1.064; Srednja vrednost revije / Medium Category Impact Factor: 1.211; WoS: AD; Avtorji / Authors: Zorman-Rojs Olga, Zdovc Irena, Dovč Alenka, Žgajnar Jaka, Slavec Brigita, Krapež Uroš, Ambrožič Jerneja
Tipologija		1.01 Izvirni znanstveni članek
3.	COBISS ID	4255610 Vir: COBISS.SI
Naslov	SLO	Odpornost proti protimikrobnim zdravilom in molekularna karakterizacija Escherichia coli z razširjenim spektrom beta-laktamaz in drugih Escherichia coli, izoliranih iz živil živalskega izvora in črevesnih izolatov človeka
	ANG	Antimicrobial resistance and molecular characterization of extended-spectrum B-lactamases and other Escherichia coli isolated from food of animal origin and human intestinal isolates
Opis	SLO	Antibiotiki smo vedno imeli za čudežna zdravila, ki rešijo mnogo življenj. Vendar pa je nesmiselna uporaba protimikrobnih zdravil povzročila nastanek odpornih bakterij. Namen te študije je bil oceniti protimikrobno odpornost bakterij Escherichia coli (n=160), izoliranih iz živil živalskega izvora, zlasti E. coli, ki proizvajajo beta-laktamaze razširjenega spektra (ESBL). E. coli smo izbrali, ker predstavljajo del normalne mikrobiote pri sesalcih ter vstopajo v prehranjevalno verigo med zakolom in rokovanjem s hrano. Posledično se lahko njihovi geni za odpornost prenesejo na patogene bakterije in mikrobioto človeka. Izvedli smo fenotipske in genotipske analize izbranih protimikrobnih odpornosti ter molekularno analizo genov za virulenco. Izolate E. coli iz živil živalskega izvora smo primerjali s kliničnimi sevi E. coli, pridobljenimi iz črevesja ljudi. E. coli ESBL

Dosežek			
			smo našli pri 9,4% izolatov iz hrane in 1,8% izolatov iz črevesja. Večina izolatov iz hrane (86,3%) in črevesja (58,1%) je pripadala komenzalnim filogenetskima skupinama A in B1. Porazdelitev štirih izmed 14 analiziranih dejavnikov virulence je bila pri izolatih iz hrane in črevesja podobna. Sevi, ki so bili izolirani iz hrane v Sloveniji, so imeli geni za odpornost in dejavnike virulence, ki lahko v primeru nepravilnega ravnanja predstavljajo problem za zagotavljanje varne hrane.
	ANG		Antibiotics have always been regarded as miraculous, saving innumerable lives. However, the unwise use of antimicrobial drugs has led to the appearance of resistant bacteria. The purpose of this study was to evaluate the antimicrobial resistance in <i>Escherichia coli</i> (n=160) isolated from food of animal origin, especially of <i>E. coli</i> producing the extended-spectrum beta-lactamases (ESBL). <i>E. coli</i> was selected as being a part of the normal microbiota in mammals and entering the food chain during slaughtering and food manipulation. Subsequently, its resistance genes can be transferred to pathogenic bacteria and human microbiota. Phenotypic and genotypic analyses of the selected antimicrobial resistances were performed together with a molecular analysis of virulence genes. <i>E. coli</i> isolates from food of animal origin were compared with clinical <i>E. coli</i> strains isolated from the human intestinal tract. ESBL-producing <i>E. coli</i> were found in 9.4% of food isolates and 1.8% of intestinal isolates. Phylogenetically, the majority of food (86.3%) and intestinal (58.1%) <i>E. coli</i> isolates were found to belong to the commensal phylogenetic groups A and B1. The distribution of four of 14 analyzed virulence factors was similar in the food and intestinal isolates. Strains isolated from food in Slovenia harbored resistance genes and virulence factors, which can constitute a problem for the food safety if not handled properly.
	Objavljeno v	International Association for Food Protection; Journal of food protection; 2017; Vol. 80, no. 1; str. 113-120; Impact Factor: 1.510; Srednja vrednost revije / Medium Category Impact Factor: 1.987; WoS: DB, JY; Avtorji / Authors: Križman Manja, Ambrožič Jerneja, Zdovc Irena, Golob Majda, Trkov Marija, Jamnikar Ciglencečki Urška, Biasizzo Majda, Kirbiš Andrej	
	Tipologija	1.01 Izvirni znanstveni članek	
4.	COBISS ID	4756602	Vir: COBISS.SI
	Naslov	SLO	Salmonella Infantis in jate pitovnih piščancev v Sloveniji: razširjenost večkratno odpornih sevov, z visoko gensko homogenostjo in nizko sposobnostjo tvorbe biofilma
		ANG	Salmonella Infantis in broiler flocks in Slovenia: the prevalence of multidrug resistant strains with high genetic homogeneity and low biofilm-forming ability
	Opis	SLO	Število jat brojlerjev, pri katerih je bila ugotovljena bakterija <i>Salmonella enterica</i> subspecies <i>enterica</i> serovar <i>Infantis</i> , v zadnjem letu v Sloveniji nepretrgoma narašča. Ker so večkratno odporni izolati <i>S. Infantis</i> močno razširjeni v perutninski industriji in zaradi prenosa preko prehranske verige lahko predstavljajo nevarnost za javno zdravje, smo pri 87 izolatih <i>S. Infantis</i> iz slovenskih jat brojlerjev preiskovali občutljivost proti protimikrobnim zdravilom, genetsko raznolikost in sposobnost tvorbe biofilma. Zgolj 8,0% izolatov je bilo občutljivih na vsa testirana protimikrobna zdravila, kar 88,5% izolatov je bilo večkratno odpornih, najpogostejši vzorec odpornosti je bil CipNxSSuT. Na podlagi elektroforeze v pulzirajočem električnem polju smo ugotovili veliko genetsko homogenost izolatov, saj si je bila velika večina izolatov podobna v več kot 90% profila PFGE. Isole smo razvrstili v pet genetskih skupin in 16 različnih profilov PFGE. Večina izolatov je bil zbrana v dveh genetskih skupinah. Izolati so imeli po večini majhno sposobnost tvorbe biofilma. Povprečna sposobnost tvorbe biofilma je bila večja pri perzistentnih sevih

Dosežek		
		kot pri domnevno neperzistentnih sevih, vendar razlika ni bila statistično značilna. Sklepamo, da je perzistenca bakterije <i>S. Infantis</i> na farmah brojlerjev bolj povezana s široko razširjenostjo bakterije v perutninski proizvodnji in z neučinkovitimi postopki razkuževanja kot pa s sposobnostjo tvorbe biofilma.
	ANG	For almost a decade, the number of <i>Salmonella enterica</i> subspecies <i>enterica</i> serovar <i>Infantis</i> -positive broiler flocks has been steadily increasing in Slovenia. Since multidrug resistant <i>S. Infantis</i> isolates are highly prevalent in the broiler meat industry and may represent a public health concern through the food chain, we investigated the antimicrobial susceptibility, genetic diversity, and biofilm-forming ability of 87 <i>S. Infantis</i> isolates from Slovenian broiler flocks. Only 8.0% of the isolates were susceptible to all of the antimicrobial agents tested, while 88.5% of the isolates were multidrug resistant, with the most common resistance pattern CipNxSSuT. Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) revealed a high genetic homogeneity as a vast majority of the isolates showed >90% PFGE profile similarity. The isolates were grouped into five clusters comprising 16 distinct XbaI PFGE profiles. The majority of isolates (65/87) were grouped in two clusters. The biofilm-forming capacity of the tested isolates was generally weak. The average biofilm formation for persistent strains was higher than for presumably non-persistent strains; however, the difference was not significant. It seems that <i>S. Infantis</i> persistence on broiler farms is more related to its widespread occurrence in the broiler production chain and ineffective disinfection protocols than to its ability to form biofilm.
	Objavljeno v	Hindawi Pub. Co.; BioMed research international; 2019; Vol. 2019; str. 1-13; Impact Factor: 2.583; Srednja vrednost revije / Medium Category Impact Factor: 3.276; Avtorji / Authors: Pate Mateja, Mičunović Jasna, Golob Majda, Vestby Lene Karine, Ocepek Matjaž
	Tipologija	1.01 Izvirni znanstveni članek
5.	COBISS ID	4716922 Vir: COBISS.SI
	Naslov	SLO <i>Salmonella typhimurium</i> med letoma 2000 in 2012: odpornost proti protimikrobnim zdravilom in PFGE vzorci iz izolatov živali, ljudi in hrane
		ANG <i>Salmonella typhimurium</i> between 2000 and 2012 : antimicrobial resistance and PFGE patterns of isolates from animals, humans and food.
	Opis	SLO <i>Salmonella Typhimurium</i> je pomembna povzročiteljica zoonoz, pri kateri se pojavlja visok odstotek proti protimikrobnim zdravilom odpornih sevov. V raziskavi smo primerjali restriksijske vzorce, pridobljene z metodo elektroforeze v pulzirajočem električnem polju (PFGE) in vzorce odpornosti 275 izolatov <i>S. Typhimurium</i> izoliranih med letoma 2000 in 2012 iz ljudi, živali in vzorcev hrane. Dokazali smo visok odstotek odpornih sevov (71,6 %). Večkratno odpornost smo ugotovili pri več kot polovici izolatov, in sicer največ pri živalih, sledita hrana in ljudje. Med 27 fenotipskimi vzorci odpornosti so bili najpogostejši trije: ACNaSuT, ACSuT in ASuT. Prva dva vzorca sta bila najpogostejša pri živalih, medtem ko so bili izolati z vzorcem ASuT najpogostejše dokazani pri ljudeh. Na podlagi makrorestrikcije z encimom XbaI smo ugotovili 72 vzorcev PFGE, razvrščenih v devet genetskih skupin, in 19 edinstvenih vzorcev. Največja je bila genetska skupina, ki je vključevala 29 vzorcev PFGE in 58,2 % vseh izolatov; med njimi sta bili dve tretjini izolatov večkratno odporni. V raziskavi smo pridobili dragocene podatke o odpornosti in vzorcih PFGE bakterije <i>S. Typhimurium</i> na nacionalni ravni, ki predstavljajo pomemben prispevek k nacionalnemu in mednarodnemu preiskovanju izbruhov.
		<i>Salmonella Typhimurium</i> is an important zoonotic pathogen with high levels of antimicrobial resistance. In the present study, we compared the pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) and antimicrobial resistance patterns of 275 <i>S. Typhimurium</i> isolates from humans, animals and food,

Dosežek		
	ANG	collected between 2000 and 2012. A high rate of antimicrobial resistance was detected (71.6%). Multidrug resistance (MDR) was detected in more than half of the isolates. The proportion of MDR isolates was the highest in animals, followed by food and humans. Among 27 phenotypically determined resistance patterns, three were found to be most common: ACNaSuT, ACSuT and ASuT. The first two patterns were the most prevalent in animal isolates, while ASuT isolates were most commonly obtained from humans. Macrorestriction with XbaI revealed 72 pulsotypes in nine clusters and 19 unique pulsotypes. By far largest cluster included 29 pulsotypes and comprised 58.2% of tested isolates; two thirds of the isolates in this cluster were MDR. This work provided valuable data about resistance and PFGE patterns of <i>S. Typhimurium</i> isolates in Slovenia, which could serve as a base for both national and multistate outbreak investigations.
Objavljeno v		Veterinarska fakulteta; Slovenian veterinary research; 2018; Vol. 55, no. 3; str. 161-170; Impact Factor: 0.250; Srednja vrednost revije / Medium Category Impact Factor: 1.119; WoS: ZC; Avtorji / Authors: Mićunović Jasna, Pate Mateja, Avberšek Jana, Očepek Matjaž
Tipologija		1.01 Izvirni znanstveni članek

8. Najpomembnejši dosežek projektne skupine na področju gospodarstva, družbenih in kulturnih dejavnosti⁶

Dosežek		
1.	COBISS ID	4303738
	Vir:	COBISS.SI
Opis	Naslov	SLO Predavanja: Okužba telet z bakterijo <i>E. coli</i> z razširjenim spektrom betalaktamaz (ESBL)
		ANG Lectures: Calf infection with <i>E. coli</i> with extended spectrum of betalactamases (ESBL)
		SLO Člani projektne skupine smo intenzivno sodelovali z veterinarji in rejci, ki se srečevali s problemi pri zdravljenju živali z odpornimi bakterijami. Največ težav so imeli rejci telet zaradi drisk pri teletih, ki jih povzroča <i>E. coli</i> z ESBL, zato smo pripravili različna predavanja in delavnice na to temo. V prispevku je prikazana problematika okužb z bakterijo <i>E. coli</i> v rejah telet. Povzročča lahko hudo obliko driske, ki se pogosto konča tudi s poginom živali. Poseben problem predstavljajo okužbe z izolati, ki so odporni proti več skupinam antibiotikov (predvsem <i>E. coli</i> z ESBL), ki še dodatno otežujejo zdravljenje. Razvoj odpornih bakterij je lahko posledica zauživanja mleka, ki vsebuje subinhibitorne količine antibiotikov v prvih dneh življenja. Najpogostejši vzroki so ostanki antibiotikov v kolostrumu zaradi presuševanja krav pred porodom ali zauživanje mleka krav po zdravljenju vimeških okužb. V primerih okužbe telet z <i>E. coli</i> z ESBL je prvi vrsti potrebno poskrbeti za učinkovito podporno terapijo.
		ANG The members of the project team collaborated intensively with veterinarians and breeders who faced problems in the treatment of animals with resistant bacteria. Most of the problems had veterinarians with the treatment of diarrhea in calves caused by <i>E. coli</i> with ESBL therefore we have prepared various lectures and workshops on this subject. The paper presents the problems of <i>E. coli</i> infection in veal breeding. It can cause a severe form of diarrhea, which often ends with an animal's death. Particularly problematic are infections with isolates that are resistant to several groups of antibiotics (especially <i>E. coli</i> ESBL), which make it more difficult to treat. The development of resistant bacteria may be due to the ingestion of milk containing subinhibitory amounts of

	Dosežek	
		antibiotics during the first days of life. The most common causes are the residues of antibiotics in the colostrum due to drying of cows or ingestion of mother's milk after the treatment of udder infection. In cases of E. coli infection with the ESBL, effective supportive care is needed first.
	Šifra	F.04 Dvig tehnološke ravni
	Objavljeno v	Slovensko bujatrično društvo; Slovensko bujatrično društvo; 2017; Str. 26-28; Avtorji / Authors: Zdovc Irena, Pirš Tina, Golob Majda, Mičunović Jasna
	Tipologija	1.09 Objavljeni strokovni prispevek na konferenci
2.	COBISS ID	4387450 Vir: COBISS.SI
	Naslov	<i>SLO</i> Vloga živali pri okužbah ljudi z LA-MRSA
		<i>ANG</i> The role of animals in human LA-MRSA infections
	Opis	<i>SLO</i> Proučevali smo okužbe ljudi s proti metilinu odporno bakterijo <i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA) v morebitni povezavi z rejnimi živalmi. Na različnih koncih Slovenije, predvsem v severovzhodnem delu, smo odvzeli vzorce na 16 kmetijah, na katerih je bil vsaj eden izmed članov gospodinjstva nedavno koloniziran ali hospitaliziran zaradi okužbe z LA-MRSA. Po epidemiološkem poizvedovanju z anketiranjem smo zbrali vzorce vseh članov gospodinjstva in vseh živali na posestvu. Ljudem smo odvzeli nadzorne kužnine (bris žrela, nosu, kože ali rane), pri živalih pa nosne brise ter skupne vzorce okolja. Z mikrodilucijsko metodo smo pri pridobljenih izolatih ugotavljali vzorce odpornosti proti protimikrobnim zdravilom in vse izolate tipizirali na osnovi stafilokoknega proteina A (tipizacija spa). Vsi izolati LA-MRSA pri ljudeh so bili odporni proti cefoksitinu, penicilinu in tetraciklinu, nekateri pa tudi proti ciprofloksacinu in klindamicinu. Pri živalih so se pojavljali različni rezistotipi, poleg cefoksitina, penicilina in tetraciklina so bili izolati odporni tudi proti nekaterim drugim antibiotikom, nismo pa ugotovili odpornosti proti ciprofloksacinu. Pri ljudeh smo v večini primerov izolirali tipa spa t011 in t034, poleg teh pa še t1451, t10765 in t1344. Prisotnost LA-MRSA pri živalih smo potrdili pri prašičih na petih kmetijah, kjer smo vsem izolatom določili tip spa t011. Predvidevamo, da so prašiči verjeten vir okužbe ljudi, vendar lahko sklepamo tudi, da se sevi LA-MRSA že širijo znotraj populacije ljudi. LA-MRSA smo namreč izolirali pri ljudeh na kmetijah, kjer so bili tako vzorci iz živali kakor tudi hlevski vzorci prahu negativni. <i>ANG</i> We studied the human infections with methicillin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA) in possible association with livestock. At different parts of Slovenia, especially in the northeast, samples were taken from 16 farms, where at least one of the household members was recently colonized or hospitalized due to infection with LA-MRSA. In MRSA positive index patient with a positive screening pattern for LA-MRSA and ST398 an epidemiological investigation with questionnaires was started. After the epidemiological inquiry the samples of all members of the household and all animals on the farm were collected. The surveillance swabs (throat, nose, skin) were obtained from all available household members, nose swabs from farm animals and dust samples from the farm environment. The antimicrobial susceptibility was performed by determining the minimum inhibitory concentration (MIC) by a microdilution method. All isolates were also tested on the basis of staphylococcal protein A (spa typing). All human MRSA isolates were resistant to cefoxitin, penicillin and tetracycline, and some also to ciprofloxacin and clindamycin. Different resistant patterns were observed in animals, in addition to cefoxitine, penicillin and tetracycline, the animals isolates were also resistant to some other antimicrobials, but no resistance to ciprofloxacin was observed. Human MRSA isolates were associated with 4 different spa types, of which t011 and t034 were most common, additionally and t1451, t10765 and t1344 were also detected. The presence of LA-MRSA in animals was confirmed in pigs on five farms, where all the isolates were

	Dosežek	
		associated with spa type t011. We assumed that pigs were probably source of human infection, but we could also conclude that LA-MRSA strains were already spreading within the human population. LA-MRSA was isolated from humans on the farms, where both animal samples and grain dust samples were negative.
	Šifra	B.06 Drugo
	Objavljeno v	Slovensko mikrobiološko društvo; Knjiga povzetkov; 2017; Str. 48; Avtorji / Authors: Golob Majda, Grmek-Košnik Irena, Dermota Urška, Rupnik Maja, Pate Mateja, Avberšek Jana, Kušar Darja, Zajc Urška, Ocepek Matjaž, Zdovc Irena
	Tipologija	1.12 Objavljeni povzetek znanstvenega prispevka na konferenci
3.	COBISS ID	4335738 Vir: COBISS.SI
	Naslov	<i>SLO</i> Primer enotnega zdravstvenega pristopa za raziskovanje okužb z LA-MRSA pri ljudeh
		<i>ANG</i> An example of one health approach to investigate LA-MRSA infections in humans
	Opis	<i>SLO</i> Namen raziskave je bil ugotoviti vpliv rejnih živali v povezavi z LA-MRSA okužbami pri ljudeh ter ugotoviti morebitno epidemiološko povezavo s primerjavo fenotipskih in genotipskih značilnosti sevov MRSA pri ljudeh in živalih na istem posestvu. MRSA rejnih živali (LA-MRSA) je pogosto prisotna pri domačih živalih, zlasti pri prašičih, zato bi lahko predstavljala kot potencialni vir za okužbe ljudi. LA-MRSA večinoma povezujemo s klonskim kompleksom (CC) 398, ki se je pojavil kot problem javnega zdravja v letu 2005 po poročilih o specifičnem tipu MRSA pri delavcih na prašičjih farmah v Evropi. V prispevku smo opisali tri primere odkrivanja okužbe ljudi z LA-MRSA (z značilnim tipom spa za živali). Pri ljudeh, ki so bili predhodno hospitalizirani ali kolonizirani z LA-MRSA, smo izvedli epidemiološko preiskavo z namenom ugotavljanja potencialnega vir kolonizacije ali okužbe. Pri anketiranju smo bolnike spraševali o njihovih možnih stikih z rejnimi živalmi ter pridobili njihovo dovoljenje za vzorčenje na kmetijah. V okviru raziskave smo odvzeli vzorce vseh družinskih članov na kmetiji, poleg tega pa smo vzorčili tudi nosne brise živali in vzorce okolja (prah). Potencialne razlike so bile ugotovljene s tipizacijskimi metodami in primerjalno genomiko. Opisan primer kaže na tesno sodelovanje humanih in veterinarskih mikrobiologov, hkrati pa je prikazal preliminarne rezultate glede vloge živali pri okužbah ljudi z MRSA. Zanimivo je tudi, da je bila v Sloveniji večina LA-MRSA izolirana pri bolnikih iz kmetijskih regij z intenzivno živinorejo.
		<i>ANG</i> The aim of the study was to determine the influence of livestock on human infections with LA-MRSA and to find the epidemiological relation between human and animal hosts by comparison the phenotypic and genotypic characteristics of humans and animals MRSA strains. Livestock associated MRSA (LA-MRSA) is often present in domestic animals, especially in pigs, therefore could serve as potential source for human infections. LA-MRSA are mainly associated with the clonal complex (CC) 398, which emerged as public health concern in 2005 after reports of a specific multilocus sequence type found in swine workers in Europe. In three case of detection of LA-MRSA infection (with characteristic spa type for animals) in human, the epidemiological inquiry were carried out to find the potential source of colonisation or infection. Additionally, samples from the patients' family members and animals on their farm were sampled. For the examination we choosed the patients with detected LA-MRSA with characteristic spa type for animals. They have been questioned about possible contacts with livestock (living on the farm) and asked for permission to sample their livestock and other animal species living in the household. We sampled the nasal swabs of animals and environment samples (dust) on farms. Potential spreads were ascertained with typing

	Dosežek	
		methods and comparative genomics. This case shows a close cooperation of human and veterinary microbiologists and gave us an insight in the role of animals for human infections with MRSA. In Slovenia, the most of the LA-MRSA were isolated from patients from the most important agricultural regions with intensive livestock breeding.
	Šifra	D.08 Upravljanje in razvoj raziskovalnega dela
	Objavljeno v	Udruženje mikrobiologa Srbije; Udruženje medicinskih mikrobiologa Srbije; Mikromed 2017; 2017; str. 162; Avtorji / Authors: Golob Majda, Grmek-Košnik Irena, Dermota Urška, Ocepek Matjaž, Zajc Urška, Kušar Darja, Pate Mateja, Avberšek Jana, Pengov Andrej, Zdovc Irena
	Tipologija	1.12 Objavljeni povzetek znanstvenega prispevka na konferenci
4.	COBISS ID	4726394 Vir: COBISS.SI
	Naslov	<i>SLO</i> Sodelovanje pri pripravi Nacionalne strategije za obvladovanje odpornosti mikrobov
		<i>ANG</i> Participation in the development of National Strategy for Combating Antibiotic-Resistant Bacteria
	Opis	<i>SLO</i> V Sloveniji pripravlja strategijo Nacionalna komisija za preudarno rabo protimikrobnih zdravil, ki jo sestavljajo strokovnjaki medicinske, veterinarske in okoljske stroke. Nekateri člani projektne skupine pri tem intenzivno sodelujejo že več let. Glavni cilj Nacionalne strategije je ugotavljanje vzrokov odpornosti proti antibiotikom in izvajanje posebnih ukrepov za preprečevanje razvoja odpornih bakterij. Mikrobiološko spremljanje odpornosti bakterij v humani in veterinarski medicini in okolju je osnova za oceno stanja v Sloveniji. Potrebujemo stabilen sistem spremljanja odpornosti, ki bo zagotavljal zanesljive in primerljive podatke. Na področju medicinske in veterinarske mikrobiologije so potrebni kompetentni mikrobiološki laboratoriji, povezani v mrežo, skupaj z nacionalnim koordinacijskim centrom in referenčnimi laboratoriji. Odkrivanje odpornosti proti antibiotikom zahteva sprejetje pristopa Eno zdravje, ki upošteva, da je zdravje ljudi povezano z zdravjem živali in okoljem. Odpornost proti antibiotikom je globalni zdravstveni problem, ki zahteva mednarodno pozornost in sodelovanje.
		<i>ANG</i> In Slovenia, the strategy is developed by the National Commission for the prudent use of antimicrobials, composed by experts from the medical, veterinary and environmental professions. Some members of the project team have been intensively involved for many years. The main objective of the National Strategy is to identify the causes of antibiotic resistance and to implement specific measures to prevent the development of resistant bacteria. Microbiological monitoring of the resistance of bacteria in human and veterinary medicine and the environment is the basis for the assessment of the situation in Slovenia. We need a stable resistance monitoring system that will provide reliable and comparable data. In the field of medical and veterinary microbiology, competent microbiological laboratories connected to the network are needed, together with the national coordination center and reference laboratories. Detection of antibiotic resistance requires the adoption of the One Health approach, which takes into account that human health is linked to animal health and the environment. Resistance to antibiotics is a global health issue that requires international attention and cooperation.
	Šifra	F.30 Strokovna ocena stanja
	Objavljeno v	Nacionalni inštitut za javno zdravje; Strokovno posvetovanje Eno zdravje 2018, Ljubljana, 7. 11. 2018; 2018; [3] f.; Avtorji / Authors: Ribič Helena, Štrumbelj Iztok, Zdovc Irena
	Tipologija	1.09 Objavljeni strokovni prispevek na konferenci

	Dosežek	
5.	COBISS ID	Vir: vpis v obrazec
	Naslov	
	SLO	Organizacija kongresov in delavnic
	ANG	Organization of congresses and workshops
	Opis	
	SLO	Člani projektna skupine (Matjaž Ocepek, Darja Kušar) so bili člani organizacijskega odbora 7. kongresa Slovenskega mikrobiološkega društva, Bled 2017, Andrej Kirbiš je predsednik org. odbora, Matjaž Ocepek in Urška Jamnikar Ciglencečki pa sta člana programskega odbora 7. veterinarskega kongresa, Matjaž Ocepek je bil član organizacijskega odbora 8th Global Summit on Microbiology & Infectious Diseases, February, 2018 Paris, France. Irena Zdovc in Urška Jamnikar Ciglencečki sta bili trikrat (Ljubljana, 2016, 2017 in 2018) članici organizacijskega odbora srečanja Eno zdravje, ki ga skupaj organizirata Veterinarska fakulteta in Nacionalni Inštitut za javno zdravje (NIJZ).
	ANG	The members of the project group (Matjaž Ocepek, Darja Kušar) were members of the organizing committee of the 7th Congress of the Slovenian Microbiological Society, Bled 2017, Andrej Kirbiš is the president of the org. Matjaž Ocepek and Urška Jamnikar Ciglencečki are members of the program committee of the 7th Veterinary congress, Matjaž Ocepek was a member of the organizing committee of the 8th Global Summit on Microbiology & Infectious Diseases, February 2018 Paris, France. Irena Zdovc and Urška Jamnikar Ciglencečki were three times (Ljubljana, 2016, 2017 and 2018) members of the organizing committee of One Health, organized jointly by the Veterinary Faculty and the National Institute of Public Health (NIJZ).
	Šifra	B.01 Organizator znanstvenega srečanja
	Objavljeno v	SICRIS/COBISS
	Tipologija	1.06 Objavljeni znanstveni prispevek na konferenci (vabljen predavanje)

9. Drugi pomembni rezultati projektne skupine²

Izsledke naših raziskav smo večkrat predstavili v različnih srednješolskih izobraževalnih ustanovah v obliki krajših izobraževanj za zaposlene. Za Aktiv veterinarjev srednjih veterinarskih šol smo pripravili predavanje z naslovom Odpornost bakterij proti antibiotikom (Ljubljana, BIC, 2016, Zdovc I.).

Člani projektne skupine smo sodelovali pri organizaciji Strokovnega srečanja ob evropskem dnevu antibiotikov (EAAD), ki je bil 17. novembra 2016 v Ljubljani, in pripravili predavanje z naslovom Pomen proti kolistinu odpornih sevov za humano in veterinarsko medicino (Zdovc I.), s katerim uresničujemo cilj izobraževanja širše strokovne javnosti.

Na sestanku Komisije za zdravstveno varstvo in reprodukcijo prašičev (Murska Sobota) je bilo izvedeno predavanje z naslovom Kaj vemo novega o odpornih bakterijah pri prašičih? (Zdovc I.). Na predavanju je bila med drugim predstavljena vsebina projekta, s posebnim poudarkom na problematiki MRSA pri prašičih. Predavanje o odpornih bakterijah (s poudarkom na E. coli ESBL) je bilo pripravljeno tudi za delavce na perutninski klavnici, kjer smo opravili del projektne naloge.

Dvakrat letno v okviru izobraževanja za pridobitev potrdila o usposobljenosti v skladu z 21. členom Uredbe Sveta (ES) št. 1099/2009 o zaščiti živali pri usmrtnosti za rdeče in belo meso zaposlenim v klavnicah med predavanjem Proces zakola in vpliv na kakovost mesa podamo izsledke projekta in poudarimo pomen kritičnih točk, kjer lahko v prehransko verigo vstopajo bakterije, tako odporne kot tudi patogene (Ljubljana, VF, 2018).

Člani projektne skupine so propagirali znanost tudi v obliki dveh intervjujev, ki so jih imeli tekom trajanja projekta (A. Kirbiš, M. Ocepek).

Pri dodiplomskem izobraževanju je povečano število ur za obravnavo odpornosti bakterij in v pripravi je kurikulum za izbirni predmet na temo pravilne izbire in uporabe antibiotikov v praksi. Nova spoznanja glede odpornosti redno predstavljamo na izobraževanjih za veterinarsko in drugo strokovno javnost.

10. Pomen raziskovalnih rezultatov projektne skupine⁸

10.1. Pomen za razvoj znanosti⁹

SLO

Člani projektne skupine so v času trajanja projekta pomembno vplivali na razvoj znanosti, saj so v tem času objavili skupaj 27 izvirnih znanstvenih člankov, 4 kratke znanstvene prispevke, 7 strokovnih prispevkov in 13 poljudnih člankov. Sodelovali so na številnih srečanjih, kjer so predstavili in objavili 12 znanstvenih prispevkov (od tega 2 vabljeni predavanji), 14 strokovnih prispevkov, 51 objavljenih povzetkov znanstvenih prispevkov (od tega 4 vabljeni predavanja) in 8 objavljenih povzetkov strokovnega prispevka. Prispevali so 2 poglavji v monografskih publikacijah in 2 sestavka v leksikonu. Članica skupine dr. O. Zorman-Rojs je izdala univerzitetni učbenik z recenzijo.

Članica projektne skupine Manja Križnar je v času trajanja projekta zagovarjala doktorsko disertacijo z naslovom Razširjenost in genotipizacija sevov *E. coli* z odpornostjo proti betalaktamskim antibiotikom in fluorokinolonom v živilih živalskega izvora. Naloga je bila v zelo tesni povezavi z delom na raziskovalnem projektu, izdelana pa je bila pod mentorstvom A. Kirbiša in somentorstvom I. Zdovc, ki sta prav tako člana projektne skupine.

V zelo tesni povezavi s projektom delom pa so v tem času na inštitutih IMP in IVHKO pripravili svoje doktorske naloge še nekateri drugi kandidati. Jasna Mičunovič (Genotipi in rezistotipi bakterije *Salmonella typhimurium* v Sloveniji v obdobju 2000 do 2012, 2018) je v povezavi s projektom opravila identifikacijo izolatov salmonel (MALDI-TOF) in vsa testiranja glede odpornosti proti antibiotikom. Mentor naloge je bil M. Ocepek, I. Zdovc pa predsednica komisije za zagovor doktorske naloge.

Maja Kaisersberger Vincek (Vpliv vezave peptidov na protimikrobno aktivnost in biokompatibilnost proteinskih substratov, 2017). Maja Kaisersberger Vincek je sodelovala pri testiranju različnih protimikrobnih snovi oz. površin, ki bi jih alternativno lahko uporabljali tudi v živilski industriji. I. Zdovc je bila članica komisije za zagovor doktorske naloge.

Tijana Ledina (Rezistencija na tetraciklin bakterija mlečne kiseline izolovanih iz tradicionalnih sireva Srbije, 2018) je v povezavi s projektom na IMP VF opravila identifikacijo bakterijskih izolatov (MALDI-TOF) in vsa testiranja glede odpornosti proti antibiotikom. I. Zdovc je bila članica komisije za zagovor doktorske naloge.

Majda Golob je z raziskavo z naslovom Razširjenost, odpornost proti antibiotikom in virulenčni dejavniki enterokokov pri rejnih živalih in v živilih živalskega izvora, v zadnji fazi izdelave svojega doktorskega dela in ga bo praviloma zagovarjala v letu 2019.

Poleg doktorskih del so v povezavi s projektom potekale tudi druge oblike raziskovalnega dela na področju odpornosti bakterij. Dijaka Biotehniškega izobraževalnega centra, Gimnazije in veterinarske šola B. Božič in T. Šentjunc sta izdelala projektno nalogo (Možnosti prenosa MRSA z rejnih živali na ljudi, 2017). Naloga je bila izdelana v okviru projekta na Inštitutu za mikrobiologijo in parazitologijo VF pod mentorstvom M. Golob, M. Pate in I. Zdovc, nagrajena pa je bila s Krkino nagrado.

Vpeljava novih metod, pridobitev referenčnih sevov bakterij in obsežna zbirka lastnih izolatov nam omogočata nadaljnje sodelovanje z drugimi znanstvenimi inštituti (IJS, Kemijski inštitut, Medicinska fakulteta, Biotehniška fakulteta ipd.) s katerimi smo v preteklem letu prijavili številne nove projektne predloge, v okviru katerih bomo nadaljevali znanstveno delo.

ANG

Project team members were significantly influenced the development of science, since in this period, 27 original scientific articles, 4 short scientific papers, 7 professional papers and 13 popular articles were published. They participated in numerous meetings where 12 scientific papers were presented and published (among them 2 invited lectures), 14 professional papers, 51 published summaries of scientific papers (among them 4 invited lectures) and 8 published summaries of the expert contribution. 2 chapters have been compiled in monographic publications and 2 in the lexicon. Member of the group dr. O. Zorman-Rojs issued a university textbook with a review.

During the duration of the project, member of the project team Manja Križnar defended her doctoral dissertation entitled The Prevalence and Genotyping of *E. coli* strains with resistance to beta-lactam antibiotics and fluoroquinolones in foodstuffs of animal origin. The task was in close connection with the work on the research project, supervisor were A. Kirbiš and co-supervisor I. Zdovc, who are also members of the project group.

In a very close connection with the project work, some other candidates prepared their doctoral theses. Jasna Mičunovič (title: Genotypes and Resistotypes of *Salmonella typhimurium* in Slovenia in the period 2000 to 2012, 2018) carried out the identification of *Salmonella* isolates (MALDI-TOF) and all antibiotic resistance tests in connection with the project. The supervisor was M. Ocepek, and I. Zdovc was the chair of the commission for defending the doctoral thesis.

Maja Kaisersberger Vincek (title: Influence of binding of peptides on antimicrobial activity and biocompatibility of protein substrates, 2017) participated in the testing of various antimicrobial surfaces that could alternatively be used in the food industry. I. Zdovc was a member of the commission for defending the doctoral thesis.

Tijana Ledina (title: Resistance to tetracycline bacteria lactic acid isolated from traditional cheeses of Serbia, 2018) in association with the project performed the identification of bacterial isolates (MALDI-TOF) and all anti-antibiotic resistance tests. I. Zdovc was a member of the commission for defending the doctoral thesis.

Majda Golob is carrying out a study titled "Prevalence, resistance to antibiotics and virulence factors of enterococci in farmed animals and foodstuffs of animal origin", and is currently in the final stage of her doctoral thesis. We will expect the task to be completed in 2019.

In addition to doctoral theses, some other research activities in the field of antimicrobial resistance were carried out. The students from the Biotechnical Education Center, Gymnasium and Veterinary School B. Božič and T. Šentjerc have elaborated a project task entitled Transferring MRSA from farm animals to humans (2017). The task was developed in the project framework at the Institute for Microbiology and Parasitology VF under the mentorship of M. Golob, M. Pate and I. Zdovc.

The introduction of new methods, the acquisition of bacterial reference strains and the extensive collection of our own isolates enable us to further cooperate with other scientific institutes (Institute of Josef Stefan), Chemical Institute, Medical faculty, Biotechnical faculty, etc.) with which we have prepared a number of new project proposals, we intend to continue the scientific work.

10.2. Pomen za razvoj Slovenije¹⁰

SLO

Rezultati naše raziskave so izjemno pomembni za nosilce dejavnosti kmetijske in živilsko predelovalne stroke na področju Slovenije, saj lahko kolonizacija, okužba živali ali kontaminacija živil z odpornimi bakterijami povzroči zelo veliko zdravstveno in ekonomsko škodo.

Zdravniki, veterinarji praktiki, patologi in epidemiologi medicinske in veterinarske stroke uporabljajo rezultate naše raziskave, da bi lažje ovrednotili razmere, kjer je pričakovati večje tveganje za razvoj in širjenje odpornih bakterij. Zelo koristni so podatki o živalskih vrstah, kjer je pričakovati večje tveganje za prenos posameznih skupin odpornih bakterij. V okviru našega projekta smo npr. prvič v Sloveniji ugotovili kolonizacijo govedi oz. telet z LA-MRSA, na kar smo bili doslej pozorni predvsem pri prašičih, manj pa pri drugih živalskih vrstah. Prav tako smo prvič izolirali sev MRSA, pri katerem ugotovljeni gen za odpornost ni bil *mecA*, ampak *mecC*. Tako si zdaj tudi lažje razlagamo prisotnost takih izolatov pri ljudeh. Diagnostični laboratoriji lahko uporabljajo protokole za testiranje bakterij glede občutljivosti za protimikrobna zdravila. Rezultati naše raziskave so pomembni za delovanje Nacionalne komisije za smotrno rabo protimikrobnih zdravil, v kateri delujejo tudi nekateri člani projektne skupine. V tem okviru so rezultati zelo pomembni tudi za pripravo Slovenske Strategije za zmanjšano uporabo antibiotikov, tako v zdravstvu kot tudi v veterinarstvu in kmetijstvu.

Posamezni člani projektne skupine so tudi ustanovni člani Centra odličnosti NAMASTE, v okviru katerega proučujejo protimikrobni učinek nano materialov, ki jih preizkušajo v okoljih živilsko predelovalne industrije. Preko tega centra, ki ima sedež na Inštitutu Jožef Stefan, zelo dobro sodelujejo s številnimi partnerji z različnih področij industrije.

Naši rezultati prispevajo k razumevanju pomembnosti odpornih bakterij na področju javnega zdravstva, kmetijstva in varovanja okolja.

Zdravje: Vse skupine odpornih bakterij, ki smo jih preučevali v projektni nalogi, so potencialni povzročitelji okužb pri ljudeh. Okužbam so izpostavljeni tako rejci in njihovi družinski člani, veterinarji, vozniki, delavci na klavnici in mesarji v trgovinah, lahko pa tudi potrošniki, vendar je ob upoštevanju dobre higienske prakse ta verjetnost majhna. Problemi z odpornimi enterobakterijami se lahko pojavijo pri zauživanju surovega mesa ali pri neposredni okužbi, npr. odprtih ran ali sluznic z MRSA.

Kmetijstvo in veterinarstvo: Z izjemo E. coli ESBL/AmpC, preiskovane bakterije praviloma bistveno ne prizadenejo splošnega zdravstvenega stanja živali. Znani pa so primeri težje ozdravljivih okužb z ESBL/AmpC pri perutnini in teletih, redkeje pa pri ostalih živalskih vrstah. Največji pomen za rejce bi lahko postala manjša vrednost živil, ki so kontaminirana z odpornimi bakterijami. Na podlagi rezultatov naših raziskav se lahko uredijo smernice za ukrepe, ki bodo zmanjšali kontaminiranost živil živalskega izvora, vode in drugega okolja z odpornimi bakterijami, kar bo omogočalo pridelavo bolj varne hrane.

Okolje: Prepoznavanje kritičnih mest, kjer odporne bakterije s farm in objektov za predelavo hrane lahko pridejo v okolje, npr. gnoj, odpadne vode, zrak in kontaminirane delovne površine. Tako je npr. potrebno okolico perutninskih farm obravnavati kot potencialno nevarno za prenos enterobakterij z ESBL, okolico prašičjih farm pa za prenos MRSA in ESBL. Pomemben je tudi prenos izven objektov, npr. z delovnimi stroji in kamioni za prevoz živih živali. Velika stopnja pazljivosti je potrebna tudi na klavnici, kjer lahko pride do kontaminacije delovnih površin, opreme in orodja mesarjev, zraka in odpadnih vod.

Promocija slovenske znanosti: Člani projektne skupine so vključeni v mednarodne projekte in sodelujejo s strokovnimi ustanovami kot so Evropski referenčni laboratoriji in EFSA, za katere so podatki zelo uporabni, zlasti z vidika spremljanja in preprečevanja odpornosti bakterij.

ANG

The results of our research are of great importance for the Slovenian agricultural and food processing industry, as colonization, animal infection or food contamination with resistant bacteria may cause very severe health and economic damage.

Medical and veterinary practitioners, pathologists and epidemiologists use the results of our research for evaluation of various conditions with higher risk of developing and spreading resistant bacteria. Specific data about animal species with an increased risk for transmission of certain groups of resistant bacteria, are very useful. Among our project, for the first time in Slovenia, the colonization of cattle with LA-MRSA was detected. So far, we have been focusing on such infections mainly in pigs, but less in other animal species. Furthermore, we also isolated MRSA strains with mecC gen which is responsible for methicillin resistance. This makes it easier to explain the relatively high presence of such isolates in humans.

Diagnostic laboratories may use protocols for antimicrobial susceptibility testing. Our results are important for the the National commission for the prudent use of antimicrobials. In this context, the results are very important for the development of the Slovenian Strategy for the reduced use of antimicrobials in human and veterinary medicine, and agriculture as well. Some members of the project team are founders of the NAMASTE Center of Excellence.

Among others they studied the antimicrobial effect of nano materials which have been tested for use in food processing industry. Through this center, headquartered at the Jožef Stefan Institute, they collaborate with many other partners from various fields of industry. Our results contribute to understanding the importance of resistant bacteria in the field of public health, agriculture and environmental protection.

Health: All groups of resistant bacteria that have been studied are potential agents for human infections. To infections are exposed both, breeders and their family members, veterinarians, drivers, slaughterhouse workers and butchers in shops. Consumers may also be at risk, but the probability of infection is low if they carefully follow good hygiene practice. Resistant enterobacteria can be transmitted by consuming raw meat or by direct infection, e.g. open wounds. People with impaired immune system are at greater risk.

Agriculture and veterinary medicine: With the exception of E. coli ESBL/AmpC, the investigated bacteria do not significantly affect the general health status of animals.

However, more serious infections with E. coli ESBL/AmpC in poultry and calves are known, but rarely in other animal species. For farmers, the greatest damage is the lower value of foods that are contaminated with resistant bacteria. Based on our research, we suggested guidelines with preventive measures that will reduce the contamination of foodstuffs of animal origin, water and other environment with resistant bacteria, which will enable the production of safer foods.

Environment: Identification of critical sites where resistant bacteria from the farm and food processing facilities can come into the environment, e.g. manure, waste water, air and contaminated working surfaces. For example, the poultry farm surroundings considered to be potentially dangerous for the E. coli ESBL contamination, and the pig farms for the transmission of MRSA and ESBL. It is also important to prevent the transmission of bacteria outside from farms to longer distances, e.g. with working machines and livestock trucks. Great attention is also needed on the slaughterhouse where contamination of working surfaces, slaughtering equipment, air and wastewater can occur.

Promotion of Slovenian Science: The members of the project team are involved in international projects that cooperate with professional institutions such as the European Reference Laboratories in the European Food Safety Authority.

11. Vpetost raziskovalnih rezultatov projektne skupine

11.1. Vpetost raziskave v domače okolje

Kje obstaja verjetnost, da bodo vaša znanstvena spoznanja deležna zaznavnega odziva?

- ☒ v domačih znanstvenih krogih
☒ pri domačih uporabnikih

Kdo (poleg sofinancerjev) že izraža interes po vaših spoznanjih oziroma rezultatih?^{1.1}

Zanimanje za naše raziskave kažejo:

- Nacionalna komisija za smotrno rabo protimikrobnih zdravil
- nosilci dejavnosti kmetijske in živilsko predelovalne stroke,
- diagnostični laboratoriji (laboratoriji regionalnih enot NVI)
- zdravniki, veterinarji, patologi in epidemiologi medicinske in veterinarske stroke, da bi lažje ovrednotili razmere, glede širjenja odpornih bakterij.
- druge raziskovalne institucije, predvsem za Fakulteto za farmacijo, kjer se ukvarjajo s sintezo novih antibiotikov.

11.2. Vpetost raziskave v tuje okolje

Kje obstaja verjetnost, da bodo vaša znanstvena spoznanja deležna zaznavnega odziva?

- ☒ v mednarodnih znanstvenih krogih
☐ pri mednarodnih uporabnikih

Navedite število in obliko formalnega raziskovalnega sodelovanja s tujini raziskovalnimi institucijami:^{1.2}

Sodelujemo s 4 tujimi institucijami:

- Projekt Prepare-Vet, (Danish Technical University) na področju izobraževanja
- Evropski referenčni laboratorij (EU-RL) za rezistenco bakterij v Kopenhagenu.
- Tuji strokovnjaki, ki kot zunanji eksperti vsako leto potrdijo ustreznost delovanja laboratorijev VF/NVI v skladu s standardom ISO 17025.
- Člani projektne skupine sodelujejo v SRIP (Strateško, razvojno in inovativno partnerstvo) na področju Zdravje-Medicina (v vertikali 4, Odporne bakterije).

Kateri so rezultati tovrstnega sodelovanja:^{1.3}

- Sodelovanje pri projektu Prepare-Vet, (DTU, Kopenhagen) ima za cilj celovito usposabljanje in izobraževanje evropskih študentov veterinarstva na področju smotrne rabe protimikrobnih zdravil.
- Sodelovanje z Evropskim referenčnim laboratorijem za rezistenco v Kopenhagenu- zaradi zunanjega preverjanja usposobljenosti laboratorijev za izolacijo in identifikacijo odpornih bakterij (*E. coli*, *S. aureus*, *Enterococcus* sp., *Salmomella* sp., *Campylobacter* spp.).
- Tuji strokovnjaki so udeleženi pri preverjanju zagotavljanja kakovosti s področja ugotavljanja odpornosti bakterij. Nadzor izvajajo v okviru Slovenske akreditacije (SA), kjer kot zunanji eksperti vsako leto potrdijo ustreznost delovanja laboratorijev VF/NVI v skladu s standardom ISO 17025.
- Člani projektne skupine sodelujejo v SRIP (Strateško, razvojno in inovativno partnerstvo) na področju Zdravje-Medicina (v vertikali 4, Odporne bakterije). Naložbo sofinancirata RS in EU iz Evropskega sklada za regionalni razvoj.

12. Označite, katerega od navedenih ciljev ste si zastavili pri projektu, katere konkretne rezultate ste dosegli in v kakšni meri so doseženi rezultati uporabljeni

Cilj		
F.01	Pridobitev novih praktičnih znanj, informacij in veščin	
	Zastavljen cilj	☒ DA ☐ NE
	Rezultat	Dosežen
	Uporaba rezultatov	V celoti
F.02	Pridobitev novih znanstvenih spoznanj	
	Zastavljen cilj	☒ DA ☐ NE
	Rezultat	Dosežen
	Uporaba rezultatov	Uporabljen bo v naslednjih 3 letih
F.03	Večja usposobljenost raziskovalno-razvojnega osebja	
	Zastavljen cilj	☒ DA ☐ NE
	Rezultat	Dosežen
	Uporaba rezultatov	V celoti
F.04	Dvig tehnološke ravni	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☒ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.05	Sposobnost za začetek novega tehnološkega razvoja	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☒ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.06	Razvoj novega izdelka	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☒ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.07	Izboljšanje obstoječega izdelka	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☒ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.08	Razvoj in izdelava prototipa	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☒ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.09	Razvoj novega tehnološkega procesa oz. tehnologije	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☒ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.10	Izboljšanje obstoječega tehnološkega procesa oz. tehnologije	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☒ NE

	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.11	Razvoj nove storitve	
	Zastavljen cilj	☒ DA ☐ NE
	Rezultat	Dosežen
	Uporaba rezultatov	V celoti
F.12	Izboljšanje obstoječe storitve	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☒ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.13	Razvoj novih proizvodnih metod in instrumentov oz. proizvodnih procesov	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☒ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.14	Izboljšanje obstoječih proizvodnih metod in instrumentov oz. proizvodnih procesov	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☒ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.15	Razvoj novega informacijskega sistema/podatkovnih baz	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☒ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.16	Izboljšanje obstoječega informacijskega sistema/podatkovnih baz	
	Zastavljen cilj	☒ DA ☐ NE
	Rezultat	Dosežen
	Uporaba rezultatov	Uporabljen bo v naslednjih 3 letih
F.17	Prenos obstoječih tehnologij, znanj, metod in postopkov v prakso	
	Zastavljen cilj	☒ DA ☐ NE
	Rezultat	Dosežen
	Uporaba rezultatov	Uporabljen bo v naslednjih 3 letih
F.18	Posredovanje novih znanj neposrednim uporabnikom (seminarji, forumi, konference)	
	Zastavljen cilj	☒ DA ☐ NE
	Rezultat	Dosežen
	Uporaba rezultatov	V celoti
F.19	Znanje, ki vodi k ustanovitvi novega podjetja ("spin off")	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☒ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	

F.20	Ustanovitev novega podjetja ("spin off")	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☒ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.21	Razvoj novih zdravstvenih/diagnostičnih metod/postopkov	
	Zastavljen cilj	☒ DA ☐ NE
	Rezultat	Dosežen
	Uporaba rezultatov	Delno
F.22	Izboljšanje obstoječih zdravstvenih/diagnostičnih metod/postopkov	
	Zastavljen cilj	☒ DA ☐ NE
	Rezultat	Dosežen
	Uporaba rezultatov	V celoti
F.23	Razvoj novih sistemskih, normativnih, programskih in metodoloških rešitev	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☒ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.24	Izboljšanje obstoječih sistemskih, normativnih, programskih in metodoloških rešitev	
	Zastavljen cilj	☒ DA ☐ NE
	Rezultat	Dosežen
	Uporaba rezultatov	Delno
F.25	Razvoj novih organizacijskih in upravljavskih rešitev	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☒ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.26	Izboljšanje obstoječih organizacijskih in upravljavskih rešitev	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☒ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.27	Prispevek k ohranjanju/varovanju naravne in kulturne dediščine	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☒ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.28	Priprava/organizacija razstave	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☒ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.29	Prispevek k razvoju nacionalne kulturne identitete	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☒ NE

	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.30	Strokovna ocena stanja	
	Zastavljen cilj	☒ DA ☐ NE
	Rezultat	Dosežen
	Uporaba rezultatov	V celoti
F.31	Razvoj standardov	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☒ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.32	Mednarodni patent	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☒ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.33	Patent v Sloveniji	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☒ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.34	Svetovalna dejavnost	
	Zastavljen cilj	☒ DA ☐ NE
	Rezultat	Dosežen
	Uporaba rezultatov	V celoti
F.35	Drugo	
	Zastavljen cilj	☒ DA ☐ NE
	Rezultat	Dosežen
	Uporaba rezultatov	Uporabljen bo v naslednjih 3 letih

Komentar

F.01, F.02, F.03. V okviru projekta smo pridobili številne nove informacije in znanstvena spoznanja o pojavnosti, vrsti in lastnostih izolatov bakterij s posebnimi oblikami odpornosti, pridobljenimi iz živali, farmskega okolja in okolja klavniške industrije. Pri tem so sodelovali raziskovalci iz vseh sodelujočih inštitutov in se ob tem dodatno izpopolnjevali in usposabljali.

F.11, F.12. S posodobitvijo diagnostičnih postopkov lahko ponudimo širši spekter preiskav za izolacijo odpornih bakterij (npr. izolacija proti kolistinu odpornih enterobakterij z usmerjeno preiskavo na selektivnih gojiščih), testiranja občutljivosti oz. odpornosti ter molekularnih metod (npr. dokazovanje genov za odpornost proti karbapenemom).

F.16, F.17. Izboljšanje obstoječih podatkovnih baz je bilo očitno pri oblikovanju skupne arhivske zbirke posebno odpornih bakterij in postavitvi širše baze podatkov.

F.18. Z rezultati preiskav smo seznanili partnerje na projektu in stranke, od katerih smo pridobili vzorce oz. izolate odpornih bakterij, širši strokovni javnosti in pristojnim upravnim službam. Podatki so bili posredovani v obliki seminarjev, permanentnih izobraževanj, strokovnih posvetovanj in objav v domači in tuji strokovni literaturi.

F.21, F.22. Pregledovali smo veliko različnih vzorcev, zato je bilo potrebno nekatere standardne metode delno modificirati oz. prilagoditi vrsti in velikosti vzorca. Zaradi tega so bile posredno ali neposredno modificirane diagnostične metode. Prilagodili smo postopek za

izolacijo odpornih bakterij iz vode s filtracijo in postopek za izolacijo odpornih bakterij iz zraka.

F.24, F.30. Na podlagi ocene stanja glede pogostnosti pojavljanja odpornih bakterij smo svetovali pri izboljšanju tehnologij v smeri večje varnosti živil.

F.34. Svetovanja smo izvajali, kadar smo obravnavali večje povezane problematike, največkrat delavcem in veterinarjem na farmah prašičev, kjer je ugotovljena kolonizacija živali z MRSA. Na podlagi tipizacije z molekularnimi metodami smo pomagali pri sledenju virov okužb in predlagali ukrepe za preprečevanje nastanka novih okužb.

13. Označite potencialne vplive oziroma učinke vaših rezultatov na navedena področja

	Vpliv	Ni vpliva	Majhen vpliv	Srednji vpliv	Velik vpliv	
G.01	Razvoj visokošolskega izobraževanja					
G.01.01.	Razvoj dodiplomskega izobraževanja	☐	☐	☐	☒	
G.01.02.	Razvoj podiplomskega izobraževanja	☐	☐	☐	☒	
G.01.03.	Drugo:	☐	☐	☐	☐	
G.02	Gospodarski razvoj					
G.02.01	Razširitev ponudbe novih izdelkov/storitev na trgu	☐	☒	☐	☐	
G.02.02.	Širitev obstoječih trgov	☒	☐	☐	☐	
G.02.03.	Znižanje stroškov proizvodnje	☒	☐	☐	☐	
G.02.04.	Zmanjšanje porabe materialov in energije	☒	☐	☐	☐	
G.02.05.	Razširitev področja dejavnosti	☒	☐	☐	☐	
G.02.06.	Večja konkurenčna sposobnost	☒	☐	☐	☐	
G.02.07.	Večji delež izvoza	☒	☐	☐	☐	
G.02.08.	Povečanje dobička	☒	☐	☐	☐	
G.02.09.	Nova delovna mesta	☒	☐	☐	☐	
G.02.10.	Dvig izobrazbene strukture zaposlenih	☒	☐	☐	☐	
G.02.11.	Nov investicijski zagon	☐	☒	☐	☐	
G.02.12.	Drugo:	☐	☐	☐	☐	
G.03	Tehnološki razvoj					
G.03.01.	Tehnološka razširitev/posodobitev dejavnosti	☒	☐	☐	☐	
G.03.02.	Tehnološko prestrukturiranje dejavnosti	☒	☐	☐	☐	
G.03.03.	Uvajanje novih tehnologij	☒	☐	☐	☐	
G.03.04.	Drugo:	☐	☐	☐	☐	
G.04	Družbeni razvoj					
G.04.01	Dvig kvalitete življenja	☐	☒	☐	☐	
G.04.02.	Izboljšanje vodenja in upravljanja	☒	☐	☐	☐	
G.04.03.	Izboljšanje delovanja administracije in javne uprave	☒	☐	☐	☐	
G.04.04.	Razvoj socialnih dejavnosti	☒	☐	☐	☐	
G.04.05.	Razvoj civilne družbe	☒	☐	☐	☐	
G.04.06.	Drugo:	☐	☐	☐	☐	
G.05.	Ohranjanje in razvoj nacionalne naravne in kulturne dediščine in identitete	☒	☐	☐	☐	

G.06.	Varovanje okolja in trajnostni razvoj					
G.07	Razvoj družbene infrastrukture					
G.07.01.	Informacijsko-komunikacijska infrastruktura					
G.07.02.	Prometna infrastruktura					
G.07.03.	Energetska infrastruktura					
G.07.04.	Drugo:					
G.08.	Varovanje zdravja in razvoj zdravstvenega varstva					
G.09.	Drugo:					

Komentar

G.01. V okviru dodiplomskega izobraževanja za študente veterinarstva smo v okviru predmeta Mikrobiologija in parazitologija povečali število ur v zvezi s preudarno rabo antibiotikov in spremljanja odpornosti bakterij, kar se kaže v večji osveščenosti novih generacij veterinarjev.

G.04, G.08. Rezultati projekta kažejo smernice, kako zmanjšati kontaminiranost živil živalskega izvora z odpornimi bakterijami in povečati osveščenost oz. znanje potrošnikov v smeri varnejše priprave hrane, kar bo imelo vpliv na varovanje zdravja in razvoj zdravstvenega varstva.

14. Naslov spletne strani za projekte, odobrene na podlagi javnih razpisov za sofinanciranje raziskovalnih projektov za leti 2016 in 2017¹⁴

<https://www.vf.uni-lj.si/podrocje/izvor-sirjenje-odpornih-bakterij-preko-zivil-zivalskega-izvora>

C. IZJAVE

Podpisani izjavljam/o, da:

- so vsi podatki, ki jih navajamo v poročilu, resnični in točni;
- se strinjamo z obdelavo podatkov v skladu z zakonodajo o varstvu osebnih podatkov za potrebe ocenjevanja in obdelavo teh podatkov za evidence ARRS;
- so vsi podatki v obrazcu v elektronski obliki identični podatkom v obrazcu v pisni obliki (v primeru, da poročilo ne bo oddano z digitalnima podpisoma);
- so z vsebino zaključnega poročila seznanjeni in se strinjajo vsi soizvajalci projekta;
- bomo sofinancerjem istočasno z zaključnim poročilom predložili tudi elaborat na zgoščenki (CD), ki ga bomo posredovali po pošti, skladno z zahtevami sofinancerjev.

Podpisi:

*zastopnik oz. pooblaščen oseba
raziskovalne organizacije:*

in

vodja raziskovalnega projekta:

Univerza v Ljubljani, Veterinarska
fakulteta

Irena Zdovc

ŽIG

Datum:

13.3.2019

Oznaka poročila: ARRS-CRP-ZP-2019/11

- ¹ Napišite povzetek raziskovalnega projekta (največ 3.000 znakov v slovenskem in angleškem jeziku). [Nazaj](#)
- ² Navedite cilje iz prijave projekta in napišite, ali so bili cilji projekta doseženi. Navedite ključne ugotovitve, znanstvena spoznanja, rezultate in učinke raziskovalnega projekta in njihovo uporabo ter sodelovanje s tujimi partnerji. Največ 12.000 znakov vključno s presledki (približno dve strani, velikost pisave 11). [Nazaj](#)
- ³ Realizacija raziskovalne hipoteze. Največ 3.000 znakov vključno s presledki (približno pol strani, velikost pisave 11). [Nazaj](#)
- ⁴ Navedite morebitna bistvena odstopanja in spremembe od predvidenega programa dela raziskovalnega projekta, zapisanega v prijavi raziskovalnega projekta. Navedite in utemeljite tudi spremembe sestave projektne skupine v zadnjem letu izvajanja projekta. Če sprememb ni bilo, navedite »Ni bilo sprememb«. Največ 6.000 znakov vključno s presledki (približno ena stran, velikosti pisave 11). [Nazaj](#)
- ⁵ Navedite dosežke na raziskovalnem področju (največ deset), ki so nastali v okviru tega projekta.

Raziskovalni dosežek iz obdobja izvajanja projekta (do oddaje zaključnega poročila) vpišete tako, da izpolnite COBISS kodo dosežka – sistem nato sam izpolni naslov objave, naziv, IF in srednjo vrednost revije, naziv FOS področja ter podatek, ali je dosežek uvrščen v A'' ali A'. [Nazaj](#)
- ⁶ Navedite dosežke na področju gospodarstva, družbenih in kulturnih dejavnosti (največ pet), ki so nastali v okviru tega projekta.

Dosežek iz obdobja izvajanja projekta (do oddaje zaključnega poročila) vpišete tako, da izpolnite COBISS kodo dosežka, sistem nato sam izpolni podatke, manjkajoče rubrike o dosežku pa izpolnite.

Dosežek na področju gospodarstva, družbenih in kulturnih dejavnosti je po svoji strukturi drugačen kot znanstveni dosežek. Povzetek znanstvenega dosežka je praviloma povzetek bibliografske enote (članka, knjige), v kateri je dosežek objavljen.

Povzetek dosežka na področju gospodarstva, družbenih in kulturnih dejavnosti praviloma ni povzetek bibliografske enote, ki ta dosežek dokumentira, ker je dosežek sklop več rezultatov raziskovanja, ki je lahko dokumentiran v različnih bibliografskih enotah. COBISS ID zato ni enoznačen izjemoma pa ga lahko tudi ni (npr. prehod mlajših sodelavcev v gospodarstvo na pomembnih raziskovalnih nalogah, ali ustanovitev podjetja kot rezultat projekta ... - v obeh primerih ni COBISS ID). [Nazaj](#)
- ⁷ Navedite rezultate raziskovalnega projekta iz obdobja izvajanja projekta (do oddaje zaključnega poročila) v primeru, da katerega od rezultatov ni mogoče navesti v točkah 7 in 8 (npr. v sistemu COBISS rezultat ni evidentiran). Največ 2.000 znakov, vključno s presledki. [Nazaj](#)
- ⁸ Pomen raziskovalnih rezultatov za razvoj znanosti in za razvoj Slovenije bo objavljen na spletni strani: <http://sicris.izum.si/> za posamezen projekt, ki je predmet poročanja. [Nazaj](#)
- ⁹ Največ 4.000 znakov, vključno s presledki. [Nazaj](#)
- ¹⁰ Največ 4.000 znakov, vključno s presledki. [Nazaj](#)
- ¹¹ Največ 500 znakov, vključno s presledki. [Nazaj](#)
- ¹² Največ 500 znakov, vključno s presledki. [Nazaj](#)
- ¹³ Največ 1.000 znakov, vključno s presledki. [Nazaj](#)
- ¹⁴ Izvajalec mora za projekte, odobrene na podlagi Javnega razpisa za izbiro raziskovalnih projektov Ciljnega raziskovalnega programa »CRP 2016« v letu 2016, Ciljnega raziskovalnega programa »CRP 2017« v letu 2017 in Javnega razpisa za izbiro raziskovalnih projektov Ciljnega raziskovalnega programa »Zagotovimo.si hrano za jutri« v letu 2016, na spletnem mestu svoje RO odpreti posebno spletno stran, ki je namenjena projektu. Obvezne vsebine spletne strani so: vsebinski opis projekta z osnovnimi podatki glede financiranja, sestava projektne skupine s povezavami na SICRIS, faze projekta in njihova realizacija, bibliografske reference, ki izhajajo neposredno iz izvajanja projekta ter logotip ARRS in drugih sofinancerjev. Spletna stran mora ostati aktivna še 5 let po zaključku projekta. [Nazaj](#)

Obrazec: ARRS-CRP-ZP/2019 v1.00

FF-96-55-DB-AA-9E-65-9D-0D-08-74-6C-07-D5-B3-1E-5E-49-08-A6

Priloga 1: Vsebinsko poročilo

Priloga 1 je obvezen element zaključnega poročila. Študija je raziskovalno poročilo za naročnika (MKO), ki mora vključevati vse elemente raziskovalnega dela :

- *povzetek (v slovenskem in angleškem jeziku)*
- *opis problema in ciljev;*
- *kratek povzetek ključnih ugotovitev iz literature;*
- *uporabljena metodo dela;*
- *rezultati raziskave*
- *razprava, zaključki in priporočila naročniku.*
- *morebitne priloge k poročilu (smernice, tehnični listi,...).*

Jasno je potrebna izpostaviti raziskovalni kontekst naloge, doseganje zastavljenih ciljev iz razpisa in tudi (možnosti) aplikacije ter potrebe po dodatnih raziskavah.

Pričakujemo minimalni obseg poročila 20.000 znakov brez presledkov (brez prilog). Oblika poročila je prepuščena avtorjem. Priporočena je uporaba oblike in stila pisanja znanstvenih objav. Presoja študije bo potekala iz vsebinskega pa tudi oblikovnega vidika, saj bo objavljena na spletnih straneh digitalne knjižnice.

IZVOR IN ŠIRJENJE ODPORNIH BAKTERIJ PREKO ŽIVIL ŽIV

2

THE ORIGIN AND SPREAD OF RESISTANT BACTERIA THROUGH ANIMAL ORIGIN

Irena Zdovc, Golob Majda, Jamnikar Ciglencečki Urška, Kirbiš Andrej, Krapež
Uroš, Križman Manja, Kušar Darja, Ocepek Matjaž, Pate Mateja, Pintarič Štefan,
Zajc Urška, Zorman Rojs Olga

Ključne besede: odpornost bakterij proti protimikrobnim zdravilom; MRSA; VRE; ESBL/AmpC; karbapenemaze; odpornost proti kolistinu; varna hrana

Key words: antimicrobial resistance; MRSA; VRE; ESBL/AmpC; carbapenemase; colistin resistance; food safety

POVZETEK

Odpornost bakterij proti antibiotikom je v veterinarski medicini postala velik problem tako pri ekonomskih kot tudi pri ljubiteljskih vrstah živali. Pri živalih, ki so namenjene za prehrano ljudi, imajo velik zoonotični pomen proti meticilinu odporne bakterije *Staphylococcus aureus* (Livestock-Associated ali LA-MRSA), ki so razširjene predvsem v rejah prašičev. V zadnjih letih postajajo problem tudi enterobakterije, ki izločajo betalaktamaze z razširjenim spektrom delovanja (ESBL) in proti karbapenemom odporne bakterije. Pomembni so postali tudi izolati enterobakterij z odpornostjo proti kolistinu, ki se sicer uporablja za zdravljenje predvsem perutnine in prašičev, vendar je v Sloveniji poraba zelo majhna. Zaradi pojava bakterij, ki so odporne proti karbapenemom, je namreč v humani medicini postal kolistin rezervni antibiotik (angl. *critical important antimicrobials*, CIA) za zdravljenje takih okužb. Ker obstaja možnost, da so bakterije zaradi uporabe kolistina za zdravljenje rejnih živali pridobile gene za odpornost, je poznavanje stanja pri živalih zelo pomembno. Pri gospodarskih živalih je osebni stik s človekom manj izražen, vendar lahko prihaja do prenosa odpornih bakterij (ali njihovih genov) preko hrane, kar pomeni, da se hkrati lahko kolonizira ali okuži večje število ljudi.

V naši raziskavi smo pregledovali vzorce v objektih za rejo gospodarskih živali v zadnjih dneh reje in ob klanju živali. Vse vzorce smo preiskali po laboratorijskih protokolih za usmerjeno izolacijo proti meticilinu odpornih bakterij *S. aureus* (MRSA), proti vankomicinu odpornih enterokokov (VRE) in proti aminoglikozidom v visokih koncentracijah odpornih enterokokov (HLAR). Med enterobakterijami smo preiskovali prisotnost *E. coli* z razširjenim spektrom betalaktamaz (ESBL/AmpC), *E. coli* s karbapenemazami (Carba/Oxa) in z odpornostjo proti kolistinu.

Preiskali smo različne okoljske vzorce iz farme za purane in kasneje iz klavnice, kamor so šle živali v zakol. Na farmi smo izolirali le *E. coli* ESBL na dveh mestih (prah na ventilatorjih in iztrebki miši), kasneje na klavnici pa *E. coli* AmpC na treh različnih mestih (kletke s purani, črevo in bris trupa pred hlajenjem). Rezultati preiskav na ostale odporne bakterije so bili

negativni, zato menimo, da reje puranov niso zelo problematične, potrebna pa je pazljivost, da ne pride do kontaminacije z *E. coli* na klavnici.

Za ugotavljanje sledenja morebitne kontaminacije živali med procesom klanja smo pregledali brise piščancev brojlerjev in okolja na perutninski klavnici, kjer so v enem dnevu opravili zaporedno klanje živali s treh različnih farm. Na ta način smo želeli ugotoviti, kakšna je na klavnici verjetnost kontaminacije perutninskega mesa z odpornimi bakterijami, ki so ostale na liniji klanja po predhodnem klanju. Ugotovili smo, da je velika verjetnost prenosa *E. coli* AmpC iz klavniškega okolja na trupe piščancev, vendar zaradi velike raznolikosti izolatov tega nismo mogli neposredno dokazati. Iz vzorcev perutnine je bil doslej pridobljen tudi izolat MRSA in dva identična izolata VRE.

Na prašičerejski farmi smo ugotovili prisotnost MRSA iz večine vzorcev, *E. coli* ESBL pa iz vzorcev, povezanih s fekalno kontaminacijo. Identične izolate smo ugotovili tudi iz vzorcev, ki smo jih izolirali kasneje na klavnici, zato sklepamo, da večina odpornih bakterij v klavnico pride z živalmi ob vsakokratnem klanju. Možen pa je tudi prenos bakterij pri obdelavi klavnih trupov oz. ob neupoštevanju vseh predpisanih postopkov med klanjem.

Verjetnost prenosa odpornih bakterij med različnimi vrstami živali smo preučevali na posestvu z mešano populacijo in ugotovili smo prvi primer MRSA pri teletih v Sloveniji, pri prašičih pa prvi primer kolonizacije z bakterijo MRSA, pri kateri je bil za odpornost odgovoren gen *mecC*.

Vsi omenjeni problemi imajo lahko zelo velik vpliv na zdravje ljudi, zato jih je mogoče reševati le z odgovornim in usklajenim delom vseh vpletenih strok.

ABSTRACT

The antimicrobial resistance has become a major problem in the veterinary medicine, both in economic and in pet animals. In the food-producing animals, a great zoonotic impact has been shown by the methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (Livestock-Associated, LA-MRSA), present mainly in the rearing pigs. In recent years, enterobacteria that are producing the extended spectrum beta-lactamases (ESBLs) and bacteria resistant to carbapenems are representing an increasing issue. Furthermore, isolates of enterobacteria resistant to colistin have also become important as colistin is commonly used to treat the farmed animals, especially poultry and pigs, but the consumption in Slovenia is very low. However, due to the occurrence of bacteria that are resistant to carbapenems, colistin has become a reserve antibiotic (critical important antimicrobial, CIA) in human medicine for the treatment of carbapenems-resistant enterobacterial infections. Since it is possible that bacteria have acquired genes for the resistance due to the use of colistin in farm animals, it is very important to study this bacterial resistance in animals. In livestock, the personal contact with humans is less pronounced, but the transmission of resistant bacteria (or their genes) through food may be more important, which means that more people can be colonized or infected at the same time.

In the scope of our study, samples from the animal breeding facilities in the last days of rearing were inspected in addition to the samples from the slaughtering. All the samples were tested according to laboratory protocols for the isolation of methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA), vancomycin-resistant enterococci (VRE) and high-level aminoglycoside-resistant enterococci (HLAR). Among the enterobacteria, the presence of *E. coli* with an extended spectrum of betalactamases (ESBL/AmpC), *E. coli* with carbapenemases (Carba/Oxa) and the colistin resistance were inspected.

The various environmental samples from the turkey farm and later from the affiliated slaughterhouse were inspected. At the farm, only *E. coli* ESBL was isolated from two sampling sites (dust from the fans and mice faeces), and later in the slaughterhouse *E. coli* AmpC from three different locations (transporter cages for turkeys, intestines and swabs before cooling). The results of the tests for other resistant bacteria were negative; therefore, it can be concluded that the turkey breeding farms are not very problematic. However, caution of the slaughterhouse personnel is important to avoid cross contamination with *E. coli* at the slaughter line.

For the investigation of possible contamination of the animals during the slaughtering process, swab samples were collected from broilers and from surfaces in the poultry slaughterhouse where slaughtering of animals from three different farms was performed consecutively in one day. In this manner, we aimed to determine the probability of contamination of poultry meat with resistant bacteria that remained on the slaughter line after the previous slaughtering. It was discovered that there is a high probability of transmitting *E. coli* AmpC from the abattoir environment to chicken carcasses, but due to the large variety of isolates this could not be directly confirmed. In addition, one MRSA isolate and two identical VRE isolates were also obtained from the poultry samples.

At the pig farm, the presence of MRSA was detected in most of the samples, and also *E. coli* ESBL from samples associated with faecal contamination. Identical isolates were also found from samples collected later at the slaughterhouse, thus it can be concluded that most of the resistant bacteria are probably introduced to the slaughterhouse from the animals at each slaughtering. Bacterial contamination during the manipulation of pig carcasses or due to failing the compliance with all prescribed procedures during slaughtering is also possible.

The probability of transmission of resistant bacteria among different animal species was studied at a mixed-animal farm. Surprisingly, the first case of MRSA in calves in Slovenia was discovered, and a first case in pigs of colonization with MRSA harbouring the *mecC* resistance gene.

All these problems can have a tremendous impact on the human health, thus they can be solved only with a responsible and coordinated work of all the involved professions.

1. OPIS PROBLEMA

Bakterijske okužbe so še vedno med najbolj pomembnimi vzroki za bolezni ljudi in živali. Razvoj in uporaba različnih antibiotikov sta obetala učinkovito rešitev problema, vendar je zaradi pretirane in nekritične uporabe na različnih področjih hitro prišlo do razvoja sekundarne odpornosti. V veterinarski medicini tudi v Sloveniji ugotavljamo, da se pri ljubiteljskih vrstah živali že pojavljajo okužbe z bakterijami, ki so razvile podobno stopnjo sekundarne odpornosti, kot je bila v preteklosti znana le pri ljudeh. Še bolj pomembne pa so odporne bakterije v čredah rejnih živali, ki predstavljajo velik del prehranske verige in tako lahko posredno zelo vplivajo na zdravje ljudi. Poseben problem predstavljajo bakterije, ki so hkrati odporne proti antibiotikom iz več različnih farmakoloških skupin (večkratno odporne bakterije, VOB). Med njimi so pomembne tudi bakterije z zelo specifičnimi oblikami odpornosti, predvsem proti meticilinu odporni stafilokoki (MRS), večkratno odporni *Enterococcus faecalis* in *Enterococcus faecium*, enterobakterije, ki izločajo encime betalaktamaze z razširjenim spektrom delovanja (ESBL) in karbapenemaze. V zadnjem letu so veliko pozornosti vzbudili tudi izolati enterobakterij z odpornostjo proti kolistinu, ki se sicer uporablja za zdravljenje rejnih živali, predvsem

perutnine in prašičev. Zaradi pojava bakterij, ki so odporne proti karbapenemom, je namreč v humani medicini postal kolistin rezervni antibiotik (ang. *critical important antimicrobials*, CIA) za zdravljenje takih okužb. Ker obstaja možnost, da so bakterije zaradi uporabe kolistina za zdravljenje rejnih živali pridobile gene za odpornost, je stanje glede odpornosti pri živalih potrebno temeljito raziskati. V večini primerov je možen prenos teh bakterij z živali na ljudi in obratno, zato jih v strokovni literaturi že omenjajo med povzročitelji zoonoz.

Stafilokoki, proti katerim so bili pripravljani prvi antibiotiki, so začeli razvijati mehanizme odpornosti že zelo kmalu po začetku uporabe. Naraščanje odpornosti je bilo tudi posledica tega, da se genetski zapisi za rezistenco lahko prenašajo tudi preko mobilnih genetskih enot, kot so plazmidi in transpozoni. Zaradi izločanja betalaktamaz (npr. penicilinaz) penicilin ni bil več učinkovit, zato se je pojavila potreba po novih antibiotikih. Problem je bil začasno rešen, ko so leta 1959 sintetizirali prvi polysintetični penicilin, imenovan meticilin, vendar so se že dve leti kasneje pojavili prvi odporni sevi, ki pa so imeli drugačen mehanizem odpornosti. Ti sevi so bili sposobni sintetizirati posebno obliko penicilin vezavne beljakovine (PBP2), proti kateri antibiotik ni deloval in bakterije so normalno preživele. Sevi proti meticilinu odpornih bakterij *Staphylococcus aureus* (MRSA) so bili sprva problematični le v humani medicini, kjer so predstavljali najpomembnejše bolnišnične okužbe (HA-MRSA), kasneje pa tudi v prosti populaciji (CA-MRSA). Problematika MRSA pa ima mnogo širše razsežnosti od leta 2007, ko so na Nizozemskem ugotovili, da so prašiči na številnih farmah kolonizirani s posebnim tipom ST398, ki so ga poimenovali MRSA rejnih živali ali LA-MRSA (ang. *livestock associated MRSA*). Zaradi prostega pretoka blaga in storitev znotraj EU se je LA-MRSA zelo hitro razširila po vseh državah EU in tudi v Slovenijo.

Odpornost je kodirana s posebnim genom *mecA*, ki so ga našli tudi pri živalskih izolatih koagulazno pozitivnih stafilokokov (npr. *S. aureus*, *S. pseudintermedius*, *S. schleiferi* subsp. *coagulans*). Poleg gena *mecA* so znani še nekateri drugi podobni geni za odpornost proti meticilinu, med katerimi je zagotovo najpomembnejši gen *mecC*, ki je bil prvič opisan leta 2011. Ker se pojavlja tako pri človeških kot tudi pri živalskih izolatih MRSA (predvsem izolati iz mleka govedi), je bilo to zelo pomembno odkritje tudi za veterinarsko medicino. Zaradi tega smo v Sloveniji takoj posodobili molekularno diagnostiko MRSA in vpeljali metode za detekcijo obeh genov. Glede na to, da so se v Sloveniji med človeškimi izolati MRSA že pojavili sevi z genom *mecC*, njihovo morebitno prisotnost preverjamo tudi v populacijah rejnih živali.

Enaki problemi kot pri živalskih izolatih so se posledično pojavili tudi pri bakterijah, ki kontaminirajo hrano. V zadnjem času so posebej izpostavljene različne vrste enterobakterij, ki lahko izločajo različne betalaktamaze in zato spadajo v skupino ESBL (angl. *extended spectrum beta-lactamase*). To pa pomeni, da so odporne proti vsem betalaktamskim antibiotikom.

Velik problem predstavlja tudi naraščanje odpornosti proti kinolonom, pri katerih gre za drug mehanizem rezistence. Poleg tega pa se je pojavila tudi posebna skupina sevov, pri katerih je gen za odpornost proti kinolonom na plazmidu (PMQR, angl. *plasmid mediated quinolone resistance*). Vzorci mesa so pogosto bolj kontaminirani kot individualni vzorci živali, kar je lahko posledica naknadne kontaminacije na klavnicah in v trgovinah. Pojav večkratno odpornih bakterijskih sevov pri rejnih živalih je sicer pomemben s stališča zdravja živali, še bolj pa je pomemben za zagotavljanje prehranske varnosti oz. ohranjanja zdravja ljudi. Pri rejnih živalih je osebni stik s človekom manj izražen, vendar lahko prihaja do prenosa odpornih bakterij (ali njihovih genov) preko hrane, kar pomeni, da se hkrati lahko kolonizira ali okuži večje število ljudi.

Med domačimi živalmi, ki so namenjene za prehrano ljudi, največji delež živali z večkratno odpornimi bakterijami najdemo predvsem v rejah perutnine, prašičev in govedi. Proti metilicinu odpornim sevom *S. aureus* (MRSA), ki so bili desetletja pomembni le kot povzročitelji okužb pri ljudeh, se je v zadnjih letih pridružila še pomembna skupina izolatov (Livestock-Associated ali LA-MRSA), ki so epizootiološko povezani z gospodarskimi živalmi, predvsem s prašiči oz. s posebnim klonom ST398. Pri preiskavah prašičjega mesa je bila v različnih študijah ugotovljena visoka stopnja kontaminacije z MRSA, zato je potreba po kontroli prašičjega mesa še posebno pomembna.

Problematika enterobakterij, ki izločajo ESBL/AmpC je bila, podobno kot MRSA, sprva omejena le na bolnišnične okužbe pri ljudeh, večje razsežnosti pa je dobila šele, ko so seve začeli ugotavljati tudi pri gospodarskih živalih, predvsem pri govedu in perutnini, še posebej pri brojlerjih. V Sloveniji so preliminarne testiranja o prisotnosti večkratno odpornih bakterij v mesu pokazala visoko stopnjo kontaminacije, zato je bila tudi v naši raziskavi to prednostna naloga.

V večini primerov odporni izolati spadajo med zoonotične in komezalne bakterije, ki so v osnovi za človeka nepatogene, v določenih okoliščinah pa se lahko njihovi geni za odpornost prenesejo na bakterije, ki so patogene za ljudi in/ali živali. Zato je poznavanje stanja glede njihove prisotnosti v živilih pomembno pri načrtovanju smernic za preprečevanje kontaminacije.

Najbolj znana in raziskana je naraščajoča odpornost proti protimikrobnim zdravilom, vendar ne smemo pozabiti na odpornost proti drugim protimikrobnim snovem, kot so npr. razkužila in konzervansi. Slednji so zanesljivo prisotni v živilski industriji, zato ima to lahko zelo pomembne posledice za zagotavljanje varnosti v proizvodni verigi hrane in pri živilskih izdelkih. Zaradi tega je ključnega pomena poznavanje pogostosti odpornih sevov, ki so patogeni za ljudi in živali, pa tudi drugih mikroorganizmov vzdolž celotne proizvodne verige in tudi poznavanje mehanizma in s tem vzrokov odpornosti proti različnim protimikrobnim snovem.

Odporne izolate večine omenjenih bakterijskih vrst z različnimi oblikami večkratne odpornosti že občasno ali celo pogosto izoliramo tudi iz vzorcev živali, zrejenih v Sloveniji. Zaradi tega ima veterinarska stroka dolžnost, da dobro pozna stanje v domačih rejah in živilskih obratih ter uvede ukrepe za preprečevanje širjenja odpornih bakterij preko živil živalskega izvora.

2. MATERIALI IN METODE

Pri izvedbi naše raziskave smo se prilagajali običajnim razmeram in oparilom v izbranih rejah živali (ki so se nekoliko razlikovale glede na vrsto živali ter vrsto in velikost hlevov) in predpisanemu delovnemu procesu v živilskih obratih. Zaradi tega smo morali katerega od načrtovanih postopkov izpeljati po nekoliko prilagojenem postopku ali pa smo aktivnosti smiselno spremenili. V vseh primerih pa smo uspeli pridobiti vzorce, na podlagi katerih smo lahko izpeljali zastavljene cilje.

Izbor in pregled hlevskih in klavniških objektov za sledenje odpornih bakterij: Hleve smo izbrali na način, da smo imeli v raziskavi zastopane glavne skupine rejnih živali, t.j. perutnino, prašiče in govedo. Ker smo pregled načrtovali in opravili zaradi raziskovalnega dela, smo za obisk objektov pridobili soglasja lastnikov. V večini primerov smo v raziskavo vključili posestva,

na katerih redijo le eno skupino rejnih živali, izjema je bilo zadnje posestvo, kjer je šlo za izrazito mešano živalsko populacijo (konji, govedo, koze, prašiči in perutnina). Na tem posestvu smo preučevali prenos odpornih bakterij med različnimi živalskimi vrstami. Klavnice so izbrali lastniki živali glede na ekonomsko ceno storitve oz. so bili kooperanti za posamezno mesno industrijo.

2.1. Reja puranov in klavnica za perutnino - odvzem vzorcev na kritičnih mestih

Po predlogu veterinarke, ki skrbi za kooperantske reje puranov, smo za vzorčenje izbrali gospodarstvo, kjer so bila v času reje potrebna zdravljenja z protimikrobnimi zdravili. Izbor vzorcev spremljane reje smo določili na osnovi prostorske razporeditve hlevov, pojavljanja kliničnih znakov bolezni in posledičnega antibiotičnega zdravljenja. V reji smo odvzeli naslednje vrste vzorcev:

- nastil (na več mestih, glede na enote reje)
- voda iz napajalnikov (odvzeta iz več napajalnikov)
- krma iz krmilnikov (odvzeta na več mestih)
- zrak v hlevu (odvzet s posebnim vzorčevalnikom, Air Sampler)
- brisi prezračevalnih sistemov (odvzet na več mestih)
- brisi ventilatorjev (odvzet na več mestih)
- brisi kljuk za vstop na farmo ter brisi škornjev skrbnika živali
- vzorec tal, za kar smo uporabili prevleke za obutev treh vzorčevalcev
- dodatno smo odvzeli vzorce hlevske površine, kjer je bil izhod za vodo iz objekta, v katerem smo opazili mišje iztrebke

Predvidene so bile tudi patoanatomske preiskave poginjenih živalih in odvzem vzorcev abscesov na nogah za morebitno izolacijo stafilokokov, vendar dnevnega pogina ni bilo mogoče vzorčiti po planu, ker v zadnjih dveh dneh pred vzorčenjem sploh niso imeli pogina.

Natančen načrt vzorčenja klavnice je bil pripravljen po prvem obisku, glede na lokacijske posebnosti prostorov in opreme. Na klavnici smo spremljali in vzorčili purane, ki smo jih spremljali že v reji. Po dogovoru z nosilcem živilske dejavnosti, so šle te živali tisti dan prve na linijo klanja. Pred klanjem je bila linija temeljito očiščena in razkužena, kar pomeni, da smo s tem zmanjšali oz. izključili možnost kontaminacije z bakterijami živali iz drugih rej. Na klavnici smo odvzeli:

- brise platišč koles tovornjaka, ki je pripeljal živali s farme na klavnico
- brise boksov, v katerih so bile pripeljane živali
- vzorce čiste bazenske vode za oparjanje
- vzorec bazenske vode po oparjanju živali
- brise trupov po evisceraciji
- brise nožev za evisceracijo (ročaj in rezilo)
- vsebino črevesja
- brise trupov pred hlajenjem
- meso za prodajo po koncu hlajenja

2.2. Klavnica za perutnino –klanje brojlerjev in odvzem vzorcev na kritičnih mestih

V času izvajanja projektnih nalog se je pokazala možnost za vzorčenje kokoši in površin na perutninski klavnici, kjer v enem dnevu koljejo živali iz treh različnih rej. Želeli smo ugotoviti v kolikšni meri bakterije živali, ki so bile klane prve, lahko kontaminirajo linijo klanja in vplivajo na pojav odpornih bakterij pri naslednjih skupinah živali. Za ta namen smo odvzeli po 10 brisov iz vsake skupine živali s treh različnih farm (A, B, in C):

- živali farme A po zakolu in skubljenju
- živali farme A po evisceraciji
- trupi živali farme A pred hlajenjem
- trupi živali farme A po hlajenju (pripravljene za prodajo)
- živali farme B po zakolu in skubljenju
- živali farme B po evisceraciji
- trupi živali farme B pred hlajenjem
- trupi živali farme B po hlajenju (pripravljene za prodajo)
- živali farme C po zakolu in skubljenju
- živali farme C po evisceraciji
- trupi živali farme C pred hlajenjem
- trupi živali farme C po hlajenju (pripravljene za prodajo)
- voda iz parilnika
- voda iz skubilnika pred začetkom klanja
- voda iz skubilnika po koncu klanja
- bris traku
- bris lijaka
- naključni bris

2.3. Reja prašičev in klavnica za rdeče meso - odvzem vzorcev na kritičnih mestih

Enako kot pri reji puranov smo farmo prašičev (reja B) izbrali po predlogu lečečega veterinarja. Farma je v preteklosti imela težave z zdravstvenim stanjem živali, ki jih je bilo prav tako potrebno zdraviti z antibiotiki. Izbrana reja prašičev spada med eno večjih v Sloveniji. Odojke kupujejo največ v Avstriji in jih redijo do klavne teže. Farma je imela urejene številne razkuževalne bariere, in sicer na vhodu v glavno stavbo, pri izhodu iz glavne stavbe na poti do hlevov in dvojno bariero pred vstopom do samih prašičev. Opazili smo, da je bil sam hlev slabše prezračen. V njem je bilo povečano število insektov, predvsem muh.

2.3.1. Vzorčenje na posestvu

- tla v boksih prašičev (na več mestih)
- voda iz več napajalnikov
- krma iz več krmilnikov
- zrak v hlevu (odvzet s posebnim vzorčevalnikom, Air Sampler)
- brisi na prezračevalnih sistemih
- brisi kljuk za vstop na farmo ter brisi škornjev skrbnika živali.
- kot vzorec tal smo uporabili obujke dveh vzorčevalcev.
- brisi okolice farme (zunaj ograjenega dela posestva)

2.3.2. Vzorčenje na klavnici

Na klavnici smo vzorčili prašiče, katere smo vzorčili tudi na farmi. Po dogovoru z nosilcem živilske dejavnosti so šle te živali tisti dan prve na klanje. Kar pomeni, da je bila linija temeljito očiščena in smo tako izključili vir bakterij od drugih živali. Odvzeli smo:

- brise platišč koles tovornjaka, ki je pripeljal živali
- brise tovornjaka v katerih so bile pripeljane živali, in sicer brise tal in ograje v višini nosu
- nosne brise prašičev
- vzorec vode po garanju živali (vzorec smo pridobili izredno težko, ker se živali garajo v vertikalnem položaju in umazana voda izteka neposredno v bazen za odpadno vodo; s tem je preprečeno, da živali ne pridejo v stik z isto (kontaminirano) vodo, kot v primeru horizontalnih bazenov za garanje)
- brise trupov po evisceraciji
- brise nožev za evisceracijo (ročaj in rezilo)
- vsebino črevesja
- brise trupov pred hlajenjem

2.4. Reja govedi in klavnica za rdeče meso - odvzem vzorcev na kritičnih mestih

Plan za vzorčenje govedi je bil previden za primer, če bi uspeli vzorčiti na klavnici za rdeče meso v istem dnevu, ko bi potekalo klanje prašičev in govedi. Poleg tega nam je uspelo pridobiti soglasje lastnika za vzorčenje posestva, kjer so redili različne vrste živali. Po navedbah lastnika so teleta nabavljali iz različnih rej, nato pa so jih dopitali do klavne teže. Svinje so bile kupljene na večji farmi prašičev, ki uvaža živali iz različnih drugih evropskih držav in je bila na posestvu v preteklosti že dokazana prisotnost MRSA.

2.4.1. Vzorčenje na posestvu času reje

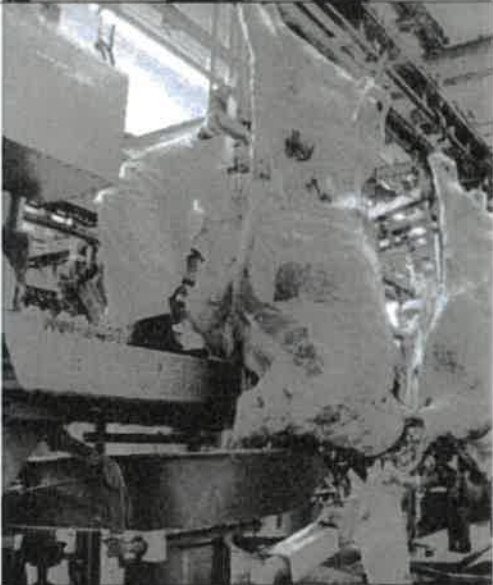
- nosni brisi konj
- brisi napajalnikov v konjskem hlevu
- brisi sten boksov oz. prahu v konjskem hlevu
- nosni brisi svinj (7)
- nosni bris merjasca
- brisi sten boksov, napajalnikov in prahu v svinjskem hlevu
- nosni brisi telet (36)
- brisi sten boksov in prahu v govejem hlevu
- nosni brisi koz (24)
- brisi sten boksov, napajalnikov in prahu v kozjem hlevu
- vzorci površin, krmilnikov in napajalnikov v kokošjem hlevu (približno 450 živali)

2.4.2. Vzorčenje na klavnici

Na klavnici za rdeče meso (kjer koljejo tudi prašiče) smo vzorčili samo teleta:

- brisi tovornjaka, tal in ograje v višini nosu
- nosni brisi po zakolu
- rektalni brisi
- brisi trupov po izkoževanju
- brisi noža mesarja (na delovnem mestu evisceracija)
- brisi noža uradnega veterinarja na liniji klanja

- črevesna vsebina telet
- brisi trupa pred hlajenjem

	(A) Vzorčenje na mestu slačenja kože.
	(B) Vzorčenje na mestu evisceracije.v.
	(C) Vzorčenje na mestu pred hlajenjem trupov

2.5. IZOLACIJA ODPORNIH BAKTERIJ

Izolacija odpornih bakterij po selektivnih metodah (izvajalec IMP): Za vzorce, ki smo jih pridobili tekom vzorčenja na farmah ter na klavnicah z namenom izolirati bakterije iste vrste s točno določenimi lastnostmi, smo že vnaprej predvidevali, da bi lahko vsebovali večje število kontaminantov, ki bi lahko motili preiskavo oz. izolacijo, zato smo vse preiskave opravili na selektivnih in/ali diferencialnih gojiščih po določenih protokolih. V naši raziskavi smo izvajali izolacijo bakterij s pet različnimi usmerjenimi preiskavami.

2.5.1. Izolacija proti meticilinu odpornih bakterij *Staphylococcus aureus* (MRSA)

Izolacijo MRSA smo izvajali po standardnem protokolu evropskega referenčnega laboratorija za odpornost bakterij proti protimikrobnim zdravilom EURL-AMR (Isolation of MRSA from dust samples, 2nd ed., 2009). Vzorce okolja smo odvzeli z brisanjem površin in z odvzemom prahu, identično kot predvideva protokol za prašičje hleve (Protocol for screening for MRSA, CRL course, Copenhagen 2009). Vzorce brisov smo prelili z 10 ml slanega bujona, vzorce površin in prahu pa z 100 ml slanega bujona ter inkubirali 16–20 ur pri 37°C. Naslednji dan smo tekočo kulturo precepili v drugo selektivno gojišče z dodatkom antibiotikov cefoksitina in aztreonama in ponovno inkubirali 24 ur pri 37°C. Tekočo kulturo smo nato cepili na trdno selektivno gojišče za izolacijo MRSA (MRSA-Brilliance, Oxoid) in plošče inkubirali 24 ur pri 37°C. Sumljive kolonije smo precepili na krvni agar ter porasle kolonije identificirali z masnim spektrofotometrom MALDI-TOF. Tako pridobljene izolate *S. aureus* smo shranili pri –80°C za nadaljnje testiranje.



Kolonije *Staphylococcus aureus* na Brilliance MRSA Chromogenic agar (Oxoid) po 24-urni inkubaciji pri 37°C.

2.5.2. Izolacija proti vankomicinu odpornih enterokokov (VRE)

Brise površin in vzorce živil (25 g ali 25 ml) smo najprej obogatili z 9-kratno količino slanega bujona (Mueller-Hinton broth MHB, Oxoid, 6,5% NaCl) in jih homogenizirali. Na enak način smo pripravili tudi vzorce okolja in jih inkubirali 16–20 ur pri 37°C. Po inkubaciji smo tekočo kulturo precepili na Slanetz-Bartley agar (SBA) za izolacijo enterokokov in trdno selektivno gojišče za izolacijo proti vankomicinu odpornih enterokokov (VRE agar, BioMerieux) in plošče inkubirali 24–48 ur pri 37°C. Sumljive kolonije smo precepili na krvni agar in porasle kolonije identificirali z masnim spektrofotometrom MALDI-TOF. Pridobljene izolate *Enterococcus faecalis* in *Enterococcus faecium* smo shranili pri –80°C za nadaljnje testiranje.



Kultura enterokokov na Slanetz-Bartleyevem agarju po 48-urni inkubaciji pri 37°C.



Kultura proti vankomicinu odpornih enterokokov na selektivnem gojišču za (VRE agar, BioMerieux) po 48-urni inkubaciji pri 37°C.

2.5.3. Izolacija *E. coli* z razširjenim spektrom beta-laktamaz (ESBL)

Izolacijo *E. coli* ESBL/AmpC smo izvajali po standardnem protokolu evropskega referenčnega laboratorija za odpornost bakterij proti protimikrobnim zdravilom, EURL-AMR (Isolation of ESBL-, AmpC- and carbapenemase-producing *E. coli* from fresh meat, October 2015, Version 3). Metoda je validirana po protokolu »Validation of selective MacConkey agar plates supplemented with 1 mg/L cefotaxime for monitoring of ESBL and AmpC producing *E. coli* in meat and animals« (Final protocol, November 2015). Za izolacijo smo uporabljali v laboratoriju pripravljeni MacConkey agar z dodatkom antibiotikov in komercialno gojišče ESBL (BioMerieux). Sumljive kolonije smo za čisto kulturo precepili na isto gojišče in porasle kolonije identificirali z masnim spektrofotometrom MALDI-TOF. Pridobljene izolate *E. coli* smo shranili –80°C za nadaljnje testiranje.



Kultura *E. coli* na gojišču MacConkey agar po 24-urni inkubaciji pri 37°C.



Kultura *E. coli* na krvnem agarju po 24-urni inkubaciji pri 37°C.

2.5.4. Izolacija *E. coli* s karbapenemazami

Izolacijo *E. coli* ESBL/AmpC smo izvajali po standardnem protokolu evropskega referenčnega laboratorija za odpornost bakterij proti protimikrobnim zdravilom, EURL-AMR (Isolation of ESBL-, AmpC- and carbapenemase-producing *E. coli* from fresh meat, October 2015, Version 3). Za izolacijo na trdnih gojiščih smo uporabili komercialno pripravljeno gojišče Carba SMART, ki je sestavljeno iz dveh delov za Carba in Oxa (BioMerieux, Francija). Sumljive kolonije smo precepili na krvni agar in porasle kolonije identificirali z masnim spektrofotometrom MALDI-TOF. Pridobljene izolate *E. coli* smo shranili –80°C za nadaljnje testiranje.

Obe metodi (za izolacijo ESBL/AmpC in izolacijo karbapenemaze pozitivnih izolatov) sta uradni metodi za izvajanje temeljne študije po navodilih Evropske komisije (13/652 EU), ki poteka v sodelovanju z Evropsko agencijo za varno hrano (EFSA).



Kultura *E. coli* na selektivnem gojišču z dodatkom karbapenemov za izolacijo proti karbapenemom odpornih bakterij po 24-urni inkubaciji pri 37°C.

2.5.5. Izolacija *E. coli* z odpornostjo proti kolistinu

Vse bakterije *E. coli*, ki so porasle na drugih selektivnih gojiščih, smo testirali tudi glede odpornosti proti kolistinu, saj je ta antibiotik v naboru protimikrobnih snovi na mikrotitrski plošči. Poleg tega smo v okviru projekta razvili tudi protokol za izolacijo *E. coli* z odpornostjo proti kolistinu. Tako smo vzorce površin, živil in brise najprej obogatili z 9-kratno količino puferirane peptonske vode in jih inkubirali 16–20 ur pri 37°C. Tekočo kulturo smo naslednji dan precepili na komercialno pripravljeno gojišče (CHROMID® Colistin R, BioMerieux) in plošče inkubirali 24 ur pri 37°C. V primeru sumljivih kolonij smo le-te precepili na krvni agar in seve identificirali z masnim spektrofotometrom MALDI-TOF. Pred shranjevanjem sevov na –80°C smo preverili še fenotipske lastnosti izolata glede odpornosti za kolistin.

Pri delu smo ugotovili, da je komercialno pripravljeno gojišče uporabno le kratek čas, saj se je njegova selektivnost s shranjevanjem gojišča v hladilniku slabšala (verjetno zaradi slabše aktivnosti kolistina).

2.6. TESTIRANJE ODPORNIH BAKTERIJ Z MIKRODILUCIJSKO METODO

Vse preiskovane bakterije, ki so porasle na selektivnih gojiščih, smo testirali z mikrodilucijsko metodo za ugotavljanje minimalne inhibitorne koncentracije (MIK). Uporabili smo ustrezne mikrotitrne plošče, ki so pripravljene za potrebe evropske študije (EU 13/562). V okviru projekta smo uporabili naslednje mikrotitrne plošče (proizvajalca Thermo Scientific™, Sensititre™): EUST za stafilokoke, EUVENC za enterokoke ter EUVSEC in EUVSEC2 za vse pridobljene seve *E. coli*.

2.6.1. Testiranje odpornosti izolatov MRSA

Izolate MRSA smo testirali glede fenotipske odpornosti proti protimikrobnim zdravilom z mikrodilucijsko metodo za določanje minimalne inhibitorne koncentracije (MIK) s komercialno pripravljenimi mikrotitrskimi ploščami EUST (Sensititre® Trek, Thermo Scientific). Na plošči EUST smo testirali občutljivost za 19 različnih antibiotikov: cefoksitin (FOX), ciprofloksacin (CIP), eritromicin (ERY), fusidična kislina (FUS), gentamicin (GEN), kanamicin (KAN), klindamicin (CLI), kloramfenikol (CHL), kvinupristin/dalfopristin (SYN), linezolid (LZD),

mupirocin (MUP), penicilin (PEN), rifampin (RIF), streptomycin (STR), sulfametoksazol (SMX), tetraciklin (TET), tiamulin (TIA), trimetoprim (TMP) in vankomicin (VAN). Dobljene rezultate smo interpretirali v skladu s standardom EUCAST in priporočili Evropskega referenčnega laboratorija za ugotavljanje odpornosti proti protimikrobnim zdravilom (EU-RL AMR).

2.6.2. Testiranje odpornosti enterokokov, Sensititre EUVENC

Za testiranje enterokokov smo uporabili komercialno pripravljeno mikrotitrsko ploščo EUVENC: *Enterococcus* spp.-specific plate format (Thermo Scientific™ Sensititre™), s katero smo ugotavljali odpornost za 12 različnih antibiotikov iz devetih različnih skupin protimikrobnih zdravil: ampicilin (AMP), ciprofloksacin (CIP), daptomicin (DAP), eritromicin (ERY), gentamicin (GEN), kloramfenikol (CHL), kvinupristin/dalfopristin (SYN), linezolid (LZD), teikoplanin (TEI), tetraciklin (TET), tigeciklin (TGC) in vankomicin (VAN). Dobljene rezultate smo interpretirali v skladu s standardom EUCAST in priporočili Evropskega referenčnega laboratorija za ugotavljanje odpornosti proti protimikrobnim zdravilom (EU-RL AMR).

2.6.3. Testiranje odpornosti *E. coli*, Sensititre EUVSEC in EUVSEC2

Za testiranje *E. coli* smo uporabili komercialno pripravljene mikrotitrsko plošče EUVSEC: *Salmonella* and *E. coli*-specific format (Thermo Scientific™ Sensititre™). Na plošči so poleg osnovnih antibiotikov iz posameznih farmakoloških skupin še indikatorski antibiotiki za ESBL/AmpC (ceftazidim in cefotaksim), za karbapenemaze (meropenem) in kolistin. V vseh primerih, ko smo na prvi plošči ugotovili odpornost proti ceftazidimu in/ali cefotaksimu, smo uporabili še drugo mikrotitrsko ploščo EUVSEC2. EUVSEC vsebuje naslednje antibiotike: ampicilin (AMP), azitromicin (AZI), cefotaksim (FOT), ceftazidim (TAZ), kloramfenikol (CHL), ciprofloksacin (CIP), kolistin (COL), gentamicin (GEN), meropenem (MERO), nalidiksijska kislina (NAL), sulfametoksazol (SMX), tetraciklin (TET), tigeciklin (TGC) in trimetoprim (TMP). EUVSEC2 pa vsebuje naslednje antibiotike: ertapenem (ETP), cefepim (FEP), cefotaksim (FOT), cefotaksim/klavulanska kislina (F/C), cefoksitin (FOX), imipenem (IMI), meropenem (MERO), ceftazidim (TAZ), ceftazidim/klavulanska kislina (T/C) in temocilin (TRM). Dobljene rezultate smo interpretirali v skladu s standardom EUCAST in priporočili Evropskega referenčnega laboratorija za ugotavljanje odpornosti proti protimikrobnim zdravilom (EU-RL AMR).

2.7. MOLEKULARNA TIPIZACIJA ODPORNIH BAKTERIJ

2.7.1. Molekularna tipizacija MRSA (*spa*, *mecA* in *mecC*) in ugotavljanje gena za toksin PVL

Iz bakterij, ki so bile fenotipsko odporne proti protimikrobnim zdravilom, smo izolirali DNA tako, da smo eno bakterijsko kolonijo (CFU) resuspendirali v 100 µl sterilne destilirane vode (SDV) ali pufra TE, suspenzijo segrevali 15 min pri 95°C in nato centrifugirali 2 min pri 12000×g. Po protokolu EURL-AMR smo ugotavljali prisotnost gena *mecA*, ki kodira beljakovino PBP2a (penicilin-binding protein 2a; (National Food Institute - DTU, Multiplex PCR for the detection of *mecA* gene, 2004). Poleg tega smo molekularno s tipizacijo *spa* ugotavljali prisotnost različnih sevov MRSA po predhodno razvitem protokolu (Stegger M in sod., 2012). Po istem protokolu smo dokazovali tudi prisotnost gena *mecC*, ki se pojavlja pri živalskih sevih (LA-MRSA), in gena *pvl* za citotoksin Pantone Valentine Levkocidin (PVL), ki pa se večinoma pojavlja pri humanih sevih (CA-MRSA).

2.7.2. Določanje genov za VRE (*vanA*, *vanB*) in faktorjev patogenosti

Pri izolatih enterokokov, ki so izkazovali fenotipsko odpornost proti vankomicinu, smo po predhodno objavljenem protokolu (Martin-Platero in sod., 2009) molekularno ugotavljali prisotnost genov (*vanA*, *vanB*), ki so odgovorni za pojav odpornosti proti vankomicinu. Poleg genov za odpornost proti protimikrobnim zdravilom smo pri določenih sevih preverjali tudi prisotnost nekaterih značilnih genov za virulenčne dejavnike (Vankerckhoven in sod., 2004, Martin-Platero in sod., 2009) kot so adhezini, toksini, različni sekrecijski faktorji in encimi. Z metodo PCR smo pri izolatih ugotavljali prisotnost najmanj naslednjih genov: *asa1*, *gelE*, *cylA*, *esp*, *hyl*, *efaA* in *ace*.

Iz bakterij, ki so bile fenotipsko odporne proti vankomicinu, smo izolirali DNA tako, da smo eno bakterijsko kolonijo (CFU) resuspendirali v 100 µl sterilne destilirane vode (SDV) ali pufra TE, suspenzijo segrevali 15 min pri 95°C in nato centrifugirali 2 min pri 12000xg. Po že objavljenih protokolih smo po optimizaciji dela v našem laboratoriju ugotavljali prisotnost genov *vanA*, *vanB*, *asa1*, *gelE*, *cylA*, *esp*, *hyl*, *efaA* in *ace*.

Vir: Martin-Platero et al., Int J Food Microbiol (2009), 132: 24-32.

Vankerckhoven et al., J Clin Microbiol (2004), 42: 4473-9.

2.7.3. Tipizacija *E. coli* z ESBL

Molekularno smo ugotavljali prisotnost genov za odpornost pri enterobakterijah predvsem tipa ESBL/AmpC. Vzorčno DNA bakterijskega lizata smo pripravili tako, da smo v mikrocentrifugirko (1,5 ml) odpipetirali 200 µl sterilne destilirane vode (SDV). Iz trdnega gojišča smo nato v mikrocentrifugirko prenesli polno cepilno zanko bakterij in jih resuspendirali s kratkim mešanjem na vibracijskem mešalniku. Mikrocentrifugirke z resuspendiranimi celicami smo inkubirali 10 min v vreli vodi. Po končani inkubaciji smo jih centrifugirali pri sobni temperaturi v namizni centrifugi pri 14.000 rpm. V novo mikrocentrifugirko smo odpipetirali 150 µl supernatanta, v katerem je bila celokupna celična DNA, ki smo jo uporabili kot matrično DNA za verižno reakcijo s polimerazo. Po protokolu Dallenne, Woodford, Pérez-Pérez in Hanson smo določali gene za ESBL/AmpC encime iz skupine blaCTX-M, blaTEM, blaSHV in blaCMY.

2.7.4. Tipizacija *E. coli* s karbapenemazami

V primeru, da bi izolati fenotipsko izkazovali odpornost proti karbapenemom, bi v nadaljnjem postopku molekularno ugotavljali prisotnost genov za karbapenemaze. Priprava vzorčne DNA bakterijskega lizata bi potekala na enak način, kot je opisano za ESBL/AmpC. V mikrocentrifugirko (1,5 ml) bi odpipetirali 200 µl sterilne destilirane vode (SDV) in iz trdnega gojišča nato v mikrocentrifugirko prenesli polno cepilno zanko bakterij ter jih resuspendirali s kratkim mešanjem na vibracijskem mešalniku. Mikrocentrifugirke z resuspendiranimi celicami bi inkubirali 10 min v vreli vodi. Po končani inkubaciji bi jih centrifugirali v namizni centrifugi pri 14.000 rpm pri sobni temperaturi. V novo mikrocentrifugirko bi nato odpipetirali 150 µl supernatanta ter tako pridobili celokupno celično DNA, ki bi jo uporabili kot matrično DNA za verižno reakcijo s polimerazo.

V vseh preiskovanih vzorcih nismo izolirali sevov *E. coli*, ki bi fenotipsko izkazovali odpornost proti karbapenemom, zato smo molekularne metode optimizirali na referenčnih sevih po

protokolu Poirel in sod. (2011), s katerim smo determinirali gene za karbapenemaze: blaIMP, blaSPM, blaAIM, blaVIM, blaOXA, blaGIM, blaBIC, blaSIM, blaNDM, blaDIM in blaKPC.

2.7.5. Določanje genov za odpornost proti kolistinu (*mcr-1* in *mcr-2*)

Za določanje genov za ugotavljanje odpornosti proti polimiksinu kolistinu pri sevih *E. coli* smo optimizirali metodo PCR za določanje genov *mcr-1* in *mcr-2*. Sekvence začetnih oligonukleotidov (CLR F/R in MCR2 IF/R) smo po priporočili EURL-AMR povzeli po predhodno objavljenih protokolih (Liu in sod., 2015; Xavier in sod., 2016).

3. REZULTATI IN RAZPRAVA

V okviru naloge smo obiskali vse rejske obrate in pripadajoče klavnice, ki smo jih navedli v planu, ter pridobili vse vrste vzorcev. Cilje smo v celoti izpolnili z odvzemom velikega števila vzorcev puranov na farmi in klavnici ter vzorcev brojlerjev ob klanju, po podobnem postopku pa tudi vzorce prašičev na farmi in nato v klavnici za rdeče meso. Poleg tega pa smo dodatno pridobili tudi vzorce na posestvu z mešano populacijo rejnih živali in vzorce ob klanju telet na klavnici za rdeče meso. Vzorce smo preiskali na MRSA, VRE, ESBL, karbapenemaze pozitivne *E. coli* in proti kolistinu odporne *E. coli*.

3.1. Primer A: pregled vzorcev puranov na farmi in ob klanju teh živali

Ugotovili smo nizek delež odpornih bakterij *E. coli* (iz dveh skupin vzorcev), ki smo jih določili za testiranje. Potrdili smo, da purani kolonizirajo z odpornimi sevi *E. coli* ESBL že v fazi reje.

Tabela 1: Izolacija odpornih bakterij na Posestvu A (farma puranov, VF-16/37024)

	Mesto odvzema	<i>S. aureus</i> MRSA	<i>Enterococcus</i> VRE/HLAR	<i>E. coli</i> ESBL/AmpC	<i>E. coli</i> Carba/oxa	<i>E. coli</i> Kolistin R
1	Nastil	negativno	negativno	negativno	negativno	negativno
2	Krma iz krmilnikov	negativno	negativno	negativno	negativno	negativno
3	Voda, napajalniki	negativno	negativno	negativno	negativno	negativno
4	Prah na ventilatorjih in policah	negativno	negativno	<i>E. coli</i> ESBL	negativno	negativno
5	Prah na krmilnikih in napajalnikih	negativno	negativno	negativno	negativno	negativno
6	Mišji iztrebki iz zunanjega zasilnega odtoka	negativno	negativno	<i>E. coli</i> ESBL	negativno	negativno
7	Vodovodna voda	negativno	negativno	negativno	negativno	negativno
8	Bris obutve lastnika	negativno	negativno	negativno	negativno	negativno
9	Bris obutve vzorčevalca	negativno	negativno	negativno	negativno	negativno
10	Bris kljuk	negativno	negativno	negativno	negativno	negativno
11	Zrak, 1000 litrov	negativno	negativno	negativno	negativno	negativno

Legenda:

MRSA – proti meticilinu odporen *Staphylococcus aureus*, VRE – proti vankomicinu odporni *Enterococcus faecalis/faecium*, HLAR – proti aminoglikozidom v visoki koncentraciji odporni *Enterococcus faecalis/faecium*, ESBL – *E. coli* z razširjenim spektrom betalaktamaz, carba/oxa R – *E. coli*, ki izločajo karbapenemaze, *E. coli* kolistin R – proti kolistinu odporne *E. coli*.

Na posestvu A smo iz vzorcev puranov med vsemi odpornimi bakterijami izolirali le odporne seve *E. coli* ESBL, ne pa tudi *E. coli* z AmpC. Pozitivni so bili vzorci prahu na ventilatorjih in

polica ter vzorci mišjih iztrebkov iz zunanega zasilnega izhoda. Oba izolata sta bila testirana glede odpornosti proti antibiotikom in pri obeh smo ugotovili identičen rezistotip.

Tabela 1a: Rezistotip sevov *E. coli* ESBL, ki je bil ugotovljen iz vzorcev okolja v puranjem hlevu na posestvu A

Oznaka seva	EUVSEC	sulfametoksazol	trimetoprim	ciprofloksacin	tetraciklin	meropenem	azitromicin	nalidiks. Kislina	cefotaksim	kloramfenikol	tigeciklin	ceftazidim	kolistin	ampicilin	gentamicin
VF-16/37024/4		>1024	>32	>8	>64	≤0.03	4	>128	>4	≤8	1	1	≤1	>64	≤0.5

Oznaka seva	EUVSEC2	cefotixin	ertapenem	imipenem	meropenem	ceftazidime	cefepime	cefotaxime/clav. Acid	ceftazidime/clav. Acid	cefotaxime	temocilin
VF-16/37024/4		4	≤0.015	≤0.12	≤0.03	1	4	≤0.06	≤0.12	16	8

Teden dni po vzorčenju so bili purani napoteni na klanje na perutninsko klavnico. Prve vzorce smo odvzeli že v času natovarjanja in prevoza s kamionom in nato v več fazah klanja. Rezultati so prikazani v tabeli 2.

Tabela 2: Izolacija odpornih bakterij na Klavnici A (klanje puranov, VF-37705)

	Mesto odvzema	<i>S. aureus</i> MRSA	<i>Enterococcus</i> VRE/HLAR	<i>E. coli</i> ESBL/AmpC	<i>E. coli</i> Carba/oxa	<i>E. coli</i> Kolistin R
1	Tovornjak, pristanišča koles	negativno	negativno	negativno	negativno	negativno
2	Kletke s purani	negativno	negativno	<i>E. coli</i> AmpC	negativno	negativno
3	Prsni žulji	negativno	negativno	negativno	negativno	negativno
4	Bazenska voda pred klanjem	negativno	negativno	negativno	negativno	negativno
5	Bazenska voda po klanju	negativno	negativno	negativno	negativno	negativno
6	Nož za evisceracijo	negativno	negativno	negativno	negativno	negativno
7	Črevo puranov	negativno	negativno	<i>E. coli</i> AmpC	negativno	negativno
8	Bris trupa po evisceraciji	negativno	negativno	negativno	negativno	negativno
9	Bris trupa pred hlajenjem	negativno	negativno	<i>E. coli</i> AmpC	negativno	negativno
10	Meso po hlajenju	negativno	negativno	negativno	negativno	negativno

Legenda:

MRSA – proti meticilinu odporen *Staphylococcus aureus*, VRE – proti vankomicinu odporni *Enterococcus faecalis/faecium*, HLAR – proti aminoglikozidom v visoki koncentraciji odporni *Enterococcus faecalis/faecium*, ESBL – *E. coli* z razširjenim spektrom betalaktamaz, carba/oxa R – *E. coli*, ki izločajo karbapenemaze, *E. coli* kolistin R – proti kolistinu odporne *E. coli*.

Podobno kot na puranji farmi, tudi med transportom in na klavnici nismo ugotovili večjega števila odpornih bakterij. Izjema so bili vzorci kletk s purani na kamionu, vzorci črevesa puranov na klavnici in brisi trupov pred hlajenjem, iz katerih smo izolirali *E. coli* AmpC. Zanimivo je bilo, da iz nobenega vzorca nismo izolirali *E. coli* ESBL, čeprav smo jih dokazali v farmskih vzorcih. Iz tega lahko sklepamo, da živali niso bile kolonizirane oz. da so bile na klavnici obdelane na način, ki ni dopuščal kontaminacije z *E. coli* ESBL med klanjem. Po drugi

strani pa dopuščamo možnost, da je med klanjem prišlo do kontaminacije *E. coli* AmpC. Možno je, da je ta bakterija del klavniškega okolja. Rezultati so prikazani v tabeli 2a.

Tabela 2a: Rezistotipa sevov *E. coli* AmpC, ki sta bila ugotovljena iz vzorcev okolja na perutninski klavnici med klanjem puranov s posestva A.

Oznaka seva	EUVSEC	sulfametoksazol	trimetoprim	ciprofloksacin	tetraciklin	meropenem	azitromicin	nalidiks. Kislina	cefotaksim	kloramfenikol	tigeciklin	ceftazidim	kolistin	ampicilin	gentamicin
VF-16/37705/2		16	≤0.25	0.25	64	≤0.03	≤2	128	2	≤8	1	4	≤1	>64	≤0.5
Oznaka seva	EUVSEC2	cefotaxitin	ertapenem	imipenem	meropenem	ceftazidime	cefepime	cefotaxime/clav. Acid	ceftazidime/clav. Acid	cefotaxime	temocillin				
VF-16/37705/2		64	≤0.015	≤0.12	≤0.03	4	≤0.06	1/4	2/4	4	4				
Oznaka seva	EUVSEC	sulfametoksazol	trimetoprim	ciprofloksacin	tetraciklin	meropenem	azitromicin	nalidiks. Kislina	cefotaksim	kloramfenikol	tigeciklin	ceftazidim	kolistin	ampicilin	gentamicin
VF-16/37705/7		16	≤0.25	0.25	≤2	≤0.03	≤2	128	>4	≤8	0.5	8	≤1	>64	≤0.5
Oznaka seva	EUVSEC2	cefotaxitin	ertapenem	imipenem	meropenem	ceftazidime	cefepime	cefotaxime/clav. Acid	ceftazidime/clav. Acid	cefotaxime	temocillin				
VF-16/37705/7		>64	0.06	≤0.12	≤0.03	8	0.25	4/4	8/4	8	4				

Trije izolati pripadajo dvema rezistotipoma, ki sta dokaj podobna, vendar pa se razlikujeta v odpornosti proti tetraciklinu. Seva iz kletk s purani (2 in 9) in iz brisov trupov pred hlajenjem (7) sta identična (odporna proti tetraciklinu), sev iz črevesa puranov (7) pa je bil drugačen (občutljiv za tetraciklin). Iz rezultatov sklepamo, da obstaja možnost, da se živalski trupi med obdelavo živali na klavnici lahko kontaminirajo z odpornimi bakterijami. Iz nobenega vzorca nismo izolirali *E. coli* z odpornostjo proti karbapenemom ali kolistinu.

3.2. Primer B: pregled vzorcev ob zaporednem klanju brojlerjev s treh različnih farm

Zaradi preverjanja možnosti kontaminacije z odpornimi bakterijami na perutninski klavnici smo dodatno pregledali še vzorce okolja in trupov na liniji klanja v času, ko so zaporedno klali živali s treh različnih farm. Ker ta del raziskave ni bil planiran, smo lahko pregledali le vzorce klavnice, ne pa tudi pripadajočih farm. Podobno kot ob klanju puranov, smo ugotovili kontaminacijo z *E. coli* AmpC.

Tabela 3: Izolacija odpornih bakterij na Klavnici B (klanje piščancev brojlerjev, VF-17/8669)

	Mesto odvzema	<i>S. aureus</i> MRSA	<i>Enterococcus</i> VRE/HLAR	<i>E. coli</i> ESBL/AmpC	<i>E. coli</i> Carba/oxa R	<i>E. coli</i> Kolistin R
1	FARMA A 1 (10x) Zakol, skubljenje	negativno	VRE <i>E. faecium</i>	negativno	negativno	negativno
2	FARMA A 2 (10x) Po evisceraciji	negativno	negativno	<i>E. coli</i> AmpC	negativno	negativno
3	FARMA A 3 (10x) Trupi pred hlajenjem (oprani)	negativno	negativno	<i>E. coli</i> AmpC	negativno	negativno
4	FARMA A 4 (10x) Trupi po hlajenju (za prodajo)	negativno	negativno	<i>E. coli</i> AmpC	negativno	negativno
5	FARMA B 1 (10x) Zakol, skubljenje	negativno	Negativno	<i>E. coli</i> ESBL	negativno	negativno
6	FARMA B 2 (10x) Po evisceraciji	negativno	negativno	<i>E. coli</i> AmpC	negativno	negativno
7	FARMA B 3 (10x) Trupi pred hlajenjem (oprani)	negativno	negativno	<i>E. coli</i> AmpC	negativno	negativno
8	FARMA B 4 (10x) Trupi po hlajenju (za prodajo)	negativno	negativno	<i>E. coli</i> AmpC	negativno	negativno
9	FARMA C 1 (10x) Zakol, skubljenje	negativno	negativno	<i>E. coli</i> AmpC		
10	FARMA C 2 (10x) Po evisceraciji	negativno	negativno	<i>E. coli</i> AmpC	negativno	negativno
11	FARMA C 3 (10x) Trupi pred hlajenjem (oprani)	negativno	negativno	<i>E. coli</i> AmpC	negativno	negativno
12	FARMA C 4 (10x) Trupi po hlajenju (za prodajo)	negativno	negativno	<i>E. coli</i> AmpC	negativno	negativno
13	W0 parilnik pred obdelavo farme A	negativno	VRE <i>E. faecium</i>	negativno	negativno	negativno
14	W1 parilnik vmes	negativno	negativno	<i>E. coli</i> AmpC	negativno	negativno
15	W2 parilnik po sk.	MRSA	negativno	negativno	negativno	negativno
16	Bris traku	negativno	negativno	negativno	negativno	negativno
17	Bris površine	negativno	negativno	negativno	negativno	negativno
18	Bris lijaka	negativno	negativno	<i>E. coli</i> ESBL	negativno	negativno
19	Bris, naključni	negativno	negativno	<i>E. coli</i> ESBL	negativno	negativno

Legenda:

MRSA – proti meticilinu odporen *Staphylococcus aureus*, VRE – proti vankomicinu odporni *Enterococcus faecalis/faecium*, HLAR – proti aminoglikozidom v visoki koncentraciji odporni *Enterococcus faecalis/faecium*, ESBL – *E. coli* z razširjenim spektrom betalaktamaz, carba/oxa R – *E. coli*, ki izločajo karbapenemaze, *E. coli* kolistin R – proti kolistinu odporne *E. coli*.

Živali z vseh treh farm so potovale po isti liniji klanja, vzorce pa smo jemali na štirih ključnih mestih, in sicer ob zakolu in skubljenju, po evisceraciji, s trupov pred hlajenjem in s trupov po hlajenju (slednji so pripravljeni za prodajo). Prvi vzorec ob začetku klanja (zakol, skubljenje) ni vseboval odpornih enterobakterij, vsi naslednji vzorci pa so bili pozitivni na *E. coli* AmpC. Ker je imel vsak izolat drugačen rezistotip nismo mogli neposredno potrditi vira kontaminacije.

Vzorci druge farme so bili zanimivi, ker smo iz vzorca ob zakolu izolirali sev *E. coli* ESBL, iz vseh naslednjih vzorcev pa *E. coli* AmpC, ki pa so bili vsi identični. Iz vzorcev tretje farme smo prav tako izolirali med seboj identične seve *E. coli* AmpC, vendar z drugačnim rezistotipom kot

so jih imeli izolati prvih dveh farm. Zelo velika raznolikost izolatov nam ni kazala posebnih zakonitosti, ki bi omogočale najti vir kontaminacije znotraj klavnice. Edino podobnost smo našli pri izolatih *E. coli* AmpC znotraj druge in tretje farme.

Bolj zanimiva pa sta bila seva *E. coli* ESBL iz lijaka in naključnega brisa okolja, ki sta imela med seboj identičen rezistotip, vendar drugačen kot izolat z druge farme.

Večje presenečenje perutninske klavnice sta pomenila dva proti vankomicinu odporna seva *Enterococcus faecium* VRE, ki smo jih izolirali iz prvega vzorca ob klanju živali s prve farme in iz vode parilnika (temperatura vode 55°C) pred klanjem. Izolata sta bila popolnoma identična in menimo, da je šlo za kontaminacijo okolja na klavnici. Izolata sta bila odporna proti vankomicinu, teikoplaninu, eritromicinu in ampicilinu, občutljiva pa za kvinopristin/dalfopristin, daptomicin, linezolid, gentamicin in kloramfenikol. Rezistotip je značilen za seve, ki imajo rezistenčni gen *vanA*, kar smo tudi dokazali z molekularnimi metodami.

Drugo presenečenje pa je bila izolacija MRSA iz vzorca vode parilnika po skubljenju (W2). Izolat je bil odporen proti tetraciklinu, ki je indikatorski antibiotik za LA-MRSA. Poleg splošne odpornosti proti betalaktamom je bil odporen še proti trimetoprimu. Iz nobenega vzorca nismo izolirali *E. coli* z odpornostjo proti karbapenemom ali kolistinu. Rezultati so prikazani v zbirni tabeli 3.

3.3. Primer C: pregled vzorcev prašičev na farmi in ob klanju

Vzorci prašičev so bili odvzeti na identičen način pot pri perutnini, z manjšimi modifikacijami glede na posebnosti reje. Glede na epizootiološko situacijo smo pričakovali veliko izolatov MRSA, vendar so bili rezultati kljub vsemu nad pričakovanimi. Na farmi smo MRSA izolirali iz vseh vzorcev, razen iz krme v krmilnikih. Zanimivo je, da smo ugotovili najbolj kritična mesta na področjih, ki so v višini glave prašičev, npr. na kamionu za transport s površine ograje v višini nosu. Vsi izolati so bili odporni proti tetraciklinu, ki je indikatorski antibiotik za LA-MRSA, vendar pa niso pripadali istemu rezistotipu. Razlikovali so se glede občutljivosti za kloramfenikol, trimetoprim, eritromicin in ciprofloksacin.

Iz večine vzorcev smo izolirali enterokoke, predvsem *Enterococcus faecium* in *E. hirae*, ki je patogen predvsem za perutnino, a ga pogosto najdemo tudi pri prašičih. Noben izolat ni bil odporen proti vankomicinu.

Presenetljiv je bil tudi visok delež *E. coli* ESBL iz različnih vzorcev okolja, nastila, vode, krme, opreme, okenskih polic (kjer hodijo glodalci) in okolice farme. Odporni sevi *E. coli* so na podlagi rezistotipa praktično v vseh primerih opredeljeni kot ESBL, kar je ravno obratno kot pri perutnini, kjer prevladuje *E. coli* AmpC. Zanimivo je, da so bili prav vsi izolati glede na rezistotip popolnoma identični. Poleg odpornosti proti betalaktamom so bili odporni še proti trimetoprimu in sulfametoksazolu, kinolonom in kloramfenikolu, ohranili pa so občutljivost za tetracikline, karbapeneme, tigeciklin, kolistin in gentamicin.

Iz nobenega vzorca nismo izolirali *E. coli* z odpornostjo proti karbapenemom ali kolistinu. Pri kolistinu smo s fenotipskimi metodami sicer dobili nekaj mejnih vrednosti MIC, vendar je končna potrditev odvisna od morebitnega dokaza genov za odpornost - *mcr1* ali *mcr2*. V času trajanja projekta so bili ugotovljeni tudi novi geni *mcr*, zaradi česar bo potrebno ponovno posodobiti molekularno diagnostiko ugotavljanja odpornosti proti kolistinu. Rezultati so prikazani v zbirni tabeli 4 in v prilogah z antibiogrami.

Tabela 4: Izolacija odpornih bakterij na Posestvu C (Farma prašičev, VF-17/28533)

	Mesto odvzema	<i>S. aureus</i> MRSA	<i>Enterococcus</i> VRE/HLAR	<i>E. coli</i> ESBL/AmpC	<i>E. coli</i> Carba/oxa	<i>E. coli</i> kolistin
1	Nastil	MRSA	Negativno <i>E. faecium</i>	<i>E. coli</i> ESBL	negativno	negativno
2	Voda iz napajalnika	MRSA	negativno	<i>E. coli</i> ESBL	negativno	negativno
3	Krma iz krmilnikov	negativno	Negativno <i>E. faecium, E. hirae</i>	<i>E. coli</i> ESBL	negativno	negativno
4 in 5	Zrak (aparati)	MRSA	Negativno <i>E. faecium, E. hirae</i>	negativno	negativno	negativno
6	Prezračevalniki	MRSA	Negativno <i>E. faecium, E. hirae</i>	negativno	negativno	negativno
7	Oprema (škornji, kljuge)	MRSA	Negativno <i>E. hirae</i>	<i>E. coli</i> ESBL	negativno	negativno
8	Okenska polica (hodijo glodalci)	MRSA	Negativno <i>E. hirae</i>	<i>E. coli</i> ESBL	negativno	negativno
9	Okolica farme	MRSA	Negativno <i>E. hirae</i>	<i>E. coli</i> ESBL	negativno	negativno
10	Nosni brisi 7x	MRSA	Negativno <i>E. faecium, E. hirae</i>	negativno	negativno	negativno
11	Bris boksa v višini nosa	MRSA	Negativno	<i>E. coli</i> ESBL	negativno	negativno

Legenda:

MRSA – proti metilicinu odporen *Staphylococcus aureus*, VRE – proti vankomicinu odporni *Enterococcus faecalis/faecium*, HLAR – proti aminoglikozidom v visoki koncentraciji odporni *Enterococcus faecalis/faecium*, ESBL – *E. coli* z razširjenim spektrom betalaktamaz, carba/oxa R – *E. coli*, ki izločajo karbapenemaze, *E. coli* kolistin R – proti kolistinu odporne *E. coli*.

Podobno sliko kot na farmi smo ugotovili tudi na klavnici, kjer smo ugotovili iste vrste rezistentnih bakterij s podobnimi rezistotipi. Delež pozitivnih vzorcev je bil sicer nižji, vendar kljub temu visok. MRSA smo spet izolirali predvsem s področij oz. površin v višini nosu prašičev, ne pa iz vode. Slednje je verjetno posledica tega, da so prašiči med obdelavo v vertikalnem položaju in vsa voda med delom odteka. Presenetile pa so nas bakterije na površini trupov pred hlajenjem, ko so že pripravljeni za prodajo. Predvidevamo, da je rizično za kontaminacijo orodje, s katerim mesarji razpolovijo trup na dva dela. Orodje gre pri razseku glave tudi čez rilec prašiča, kjer je koncentracija MRSA lahko visoka. Izolati so (enako kot na farmi) glede na odpornost pripadali dvema rezistotipoma, ki sta se razlikovala glede občutljivosti za kloramfenikol, trimetoprim, eritromicin in ciprofloksacin.

Med enterokoki so na klavnici spet prevladovali *E. hirae*, *E. faecium* in *E. faecalis*. Za razliko od farmskih izolatov so bili na klavnici vsi izolati dobro občutljivi za eritromicin.

E. coli ESBL smo izolirali iz več skupin vzorcev, tudi iz višine nosu (ker prašiči rijejo po blatu), iz vode in črevesne vsebine. Vsi izolati so imeli identičen rezistotip kot izolati s farme.

Iz nobenega vzorca nismo izolirali *E. coli* z odpornostjo proti karbapenemu ali kolistinu. Rezultati so prikazani v zbirni tabeli 5.

Tabela 5: Izolacija odpornih bakterij na Klavnici C (klavnica za rdeče meso, VF-17/29282)

	Mesto odvzema	<i>S. aureus</i> MRSA	<i>Enterococcus</i> VRE/HLAR	<i>E. coli</i> ESBL/AmpC	<i>E. coli</i> Carba/oxa	<i>E. coli</i> Kolistin R
1	Bris kamiona - tla	negativno	Negativno <i>E. hirae</i>	<i>E. coli</i> ESBL	negativno	negativno
2	Bris kamiona v višini nosa (ograja)	MRSA	Negativno <i>E. hirae</i>	<i>E. coli</i> ESBL	negativno	negativno
3	Nosni brisi prašičev 7x	MRSA	Negativno <i>E. hirae</i>	<i>E. coli</i> ESBL	negativno	negativno
4	Brisi trupa prašičev po omamljanju	MRSA	Negativno <i>E. hirae, E. faecium</i>	negativno	negativno	negativno
5	Umazana bazenska voda	negativno	Negativno <i>E. hirae, E. faecalis</i>	<i>E. coli</i> ESBL	negativno	negativno
6	Bris noža po evisceraciji 2x	negativno	Negativno <i>E. faecalis</i>	negativno	negativno	negativno
7	Bris noža veterinarja 2x	negativno	Negativno <i>E. faecalis</i>	negativno	negativno	negativno
8	Črevesna vsebina 2x	negativno	Negativno <i>E. hirae, E. faecium</i>	<i>E. coli</i> ESBL	negativno	negativno
9	Bris trupa pred hlajenjem A	MRSA	Negativno <i>E. faecalis</i>	negativno	negativno	negativno
10	Bris trupa pred hlajenjem B	negativno	Negativno <i>E. faecalis</i>	negativno	negativno	negativno
11	Bris trupa pred hlajenjem C	MRSA	Negativno <i>E. faecalis</i>	negativno	negativno	negativno

Legenda:

MRSA – proti meticilinu odporen *Staphylococcus aureus*, VRE – proti vankomicinu odporni *Enterococcus faecalis/faecium*, HLAR – proti aminoglikozidom v visoki koncentraciji odporni *Enterococcus faecalis/faecium*, ESBL – *E. coli* z razširjenim spektrom betalaktamaz, carba/oxa R – *E. coli*, ki izločajo karbapenemaze, *E. coli* kolistin R – proti kolistinu odporne *E. coli*.

3.4. Primer D: Pregled vzorcev različnih živali na mešanem posestvu

V primeru D smo želeli preveriti kako se odporne bakterije lahko prenašajo na posestvu z različnimi živalskimi vrstami. Izbrali smo ekološko naravnano posestvo, kjer redijo konje, teleta, koze, prašiče in kokoši.

Na živalsko mešanih posestvih gredo živali v zakol posamezno ali v manjših skupinah, zato smo se odločili, da smo najprej odvzeli vzorce na klavnici pri zakolu telet. Kljub zelo velikemu številu pregledanih vzorcev je bila izolacija odpornih bakterij v izjemno nizkem deležu.

Pričakovali smo, da bo preiskava na MRSA negativna v vseh primerih, vendar pa nas je zelo presenetilo dejstvo, da smo MRSA izolirali iz nosnih brisov telet. Pred to raziskavo v Sloveniji namreč še nismo nikoli izolirali MRSA pri goveji živini, razlog pa je verjetno v zelo majhnem številu preiskanih živali. Poleg tega so bili v preteklosti večinoma pregledovani mlečni vzorci krav z mastitisom, nikoli pa nosni vzorci. Izolat MRSA smo testirali glede občutljivosti za antibiotike in ugotovili rezistotip, ki izraža odpornost proti tetraciklinom, kar je značilno za LA-MRSA. Iz vseh vzorcev smo izolirali enterokoke, predvsem *E. hirae*, *E. faecalis* in *E. faecium*, noben izolat pa ni bil odporen proti vankomicinu.

E. coli z ESBL smo ugotovili le v vzorcih s tal kamiona in črevesne vsebine telet. Oba izolata sta bila identičen rezistotip. Iz nobenega vzorca nismo izolirali *E. coli* z odpornostjo proti karbapenemu ali kolistinu.

Tabela 6: Izolacija odpornih bakterij na Klavnici D (klanje telet, VF-18/31035)

	Mesta odvzema	<i>S. aureus</i> MRSA	<i>Enterococcus</i> VRE/HLAR	<i>E. coli</i> ESBL/AmpC	<i>E. coli</i> Carba/oxa R	<i>E. coli</i> Kolistin R
1	Brisi kamiona – tla, 5x	negativno	Negativno <i>E. hirae</i>	<i>E. coli</i> ESBL	negativno	negativno
2	Brisi kamiona v višini nosa (ograja, 4x)	negativno	Negativno <i>E. hirae</i>	negativno	negativno	negativno
3	Nosni brisi telet, 24x	MRSA	Negativno <i>E. hirae</i>	negativno	negativno	negativno
4	Rektalni brisi telet, 24x	negativno	Negativno <i>E. hirae, E. faecium</i>	negativno	negativno	negativno
5	Brisi trupa po evisceraciji, 8x	negativno	Negativno <i>E. hirae, E. faecalis</i>	negativno	negativno	negativno
6	Brisi nožev veterinarja, 2x	negativno	Negativno <i>E. faecalis</i>	negativno	negativno	negativno
7	Brisi nožev mesarja, 2x	negativno	Negativno <i>E. faecalis</i>	negativno	negativno	negativno
8	Črevesna vsebina telet, 2x	negativno	Negativno <i>E. hirae, E. faecium</i>	<i>E. coli</i> ESBL	negativno	negativno
9	Bris trupa pred hlajenjem, 8x	negativno	Negativno	negativno	negativno	negativno

Legenda:

MRSA – proti metilicinu odporen *Staphylococcus aureus*, VRE – proti vankomicinu odporni *Enterococcus faecalis/faecium*, HLAR – proti aminoglikozidom v visoki koncentraciji odporni *Enterococcus faecalis/faecium*, ESBL – *E. coli* z razširjenim spektrom betalaktamaz, carba/oxa R – *E. coli*, ki izločajo karbapenemaze, *E. coli* kolistin R – proti kolistinu odporne *E. coli*.

Lastnik živali se je strinjal z vzorčenjem tudi vseh ostalih živali na kmetiji, najbolj pa so nas zanimali vzorci preostalih telet in prašičev. V času vzorčenja je rejec imel v treh boksih 36 telet različnih starosti. Ker nima svoje vzreje telet, jih kupuje od različnih lastnikov in nato redi do klavne velikosti oz. teže. Brisi telet so bili negativni na MRSA, vendar je potrebno upoštevati, da so bile tedaj vzorčene druge, mlajše živali kot na klavnici. Po pričakovanju pa smo LA-MRSA izolirali iz brisov, ki smo jih odvzeli s površin stene boksa v višini nosu svinj. V boksu je bilo sedem svinj, ki jih je lastnik kupil na večji farmi prašičev, za katero je znano, da živali tudi uvažajo iz tujine. Pričakovali smo, da bo izolat MRSA, ki smo ga pridobili pri svinjah, po rezistotipu enak kot izolat telet, vendar se je od tega močno razlikoval. Izolat prašičev je bil odporen samo proti penicilinu in cefoksitinu (oz. proti vsem betalaktamskim antibiotikom), ampak še vedno dobro občutljiv za vse ostale antibiotike. Ugotovljeni rezistotip je po podatkih iz literature bolj značilen za izolate MRSA, ki imajo rezistenčni gen *mecC*.

Rezultat nas je močno presenetil, zato smo oba izolata preverili glede prisotnosti gena za odpornost in ugotovili, da ima telečji izolat gen *mecA*, svinjski pa *mecC*. Na podlagi slednjega rezultata smo tudi pojasnili zakaj smo pri fenotipskem testiranju ugotovili tako nizko stopnjo odpornosti proti antibiotikom. V obeh primerih je izvor obeh potrebno natančneje opredeliti na podlagi *spa* tipizacije. Prašičji izolat pripada *spa* tipu t1048.

Tabela 7: Izolacija odpornih bakterij na Posestvu D (kmetija z mešanimi živalskimi vrstami: konji, govedu, koze, prašiči, perutnina, mačka, VF-18/33103)

	Mesta odvzema	<i>S. aureus</i> MRSA	<i>Enterococcus</i> VRE/HLAR	<i>E. coli</i> ESBL/AmpC	<i>E. coli</i> Carba/oxa	<i>E. coli</i> Kolistin R
1	Nosni brisi, konj Luna	negativno	Negativno <i>E. faecium</i>	negativno	negativno	negativno
2	Nosni brisi, konj Johny	negativno	Negativno	negativno	negativno	negativno
3	Napajalnik, konj Johny	negativno	Negativno	negativno	negativno	negativno
4	Nosni brisi svinj, 7x	negativno	Negativno	negativno	negativno	negativno
5	Hlevski prah na ograji v boksu svinj, 2x	negativno	Negativno	negativno	negativno	negativno
6	Bris boksa svinj v višini nosa, 4x	MRSA	Negativno	negativno	negativno	negativno
7	Nosni bris merjasca, 1x	negativno	Negativno	negativno	negativno	negativno
8	Nosni bris telet, 36x	negativno	Negativno	negativno	negativno	negativno
9	Nosni bris koz, 24x	negativno	Negativno	negativno	negativno	negativno
10	Brisi napajalnika v boksu koz	negativno	negativno	negativno	negativno	negativno
11	Brisi napajalnikov in krmilnikov v hlevu s 450 kokošmi (2x)	negativno	negativno	negativno	negativno	negativno

Legenda:

MRSA – proti metiliclinu odporen *Staphylococcus aureus*, VRE – proti vankomicinu odporni *Enterococcus faecalis/faecium*, HLAR – proti aminoglikozidom v visoki koncentraciji odporni *Enterococcus faecalis/faecium*, ESBL – *E. coli* z razširjenim spektrom betalaktamaz, carba/oxa R – *E. coli*, ki izločajo karbapenemaze, *E. coli* kolistin R – proti kolistinu odporne *E. coli*.

Glede na pogosto kolonizacijo živali z MRSA na večjih slovenskih prašičerejskih obratih smo sprva sklepali, da je izvor MRSA pri teletih na posestvu verjetno povezan s svinjami, ki bi bile lahko vir okužbe za teleta. Ker so vse živali na posestvu zelo dobro oskrbovane in zdrave, posamezne živalske vrste pa ločene z boksi oz. so v različnih hlevih, je prenos MRSA na tem posestvu manj verjeten. Vendar pa so vse ostale živalske vrste (konji, koze, perutnina) dovzetne za kolonizacijo z MRSA, zato se stanje lahko hitro spremeni. MRSA se lahko prenese med hlevi z orodjem in opremo, lahko tudi z obutvijo ali hlevskim prahom. Lastnik je povedal, da občasno uporablja isto orodje za čiščenje telečjih in svinjskih boksov, kar je bil v tem primeru lahko verjeten razlog za prenos.

Glede na različnost izolatov je možnih več teorij in sicer, da so vendarle vzrok prašiči, ki imajo zaradi mešanja živali na farmah lahko hkrati tudi več različnih tipov MRSA. Za potrditev tega bi bilo potrebno vzeti svinjam več vzorcev v različnih časovnih obdobjih in tipizirati več različnih kolonij. Druga možnost pa je, da so bila teleta že bo nakupu kolonizirana z MRSA in so jo prinesla iz svojega matičnega hleva. Ta možnost je verjetna, ker rejec kupuje teleta iz različnih hlevov in tako se poveča možnost nakupa koloniziranih živali. Obstaja tudi (sicer manj verjetna možnost), da so se teleta kontaminirala na klavnici.

Med cilji naše raziskave je bilo tudi osveščanje rejcev o problematiki odpornih bakterij, zato smo se z lastnikom pogovorili o pomenu posameznih odkritij. Lastnik pred vzorčenjem ni bil seznanjen s problematiko MRSA in drugih odpornih bakterij, zato smo svetovali, da (če je mogoče) uporablja za svinje posebno orodje. Pomembno je tudi da najprej opravi čiščenje pri teletih in drugih živalih ter na koncu pri prašičih. Na posestvu živi tudi mačka, ki ima dostop do vseh živali in je prav tako dovzetna za kolonizacijo z MRSA. V času vzorčenja je ni bilo mogoče ujeti, zato je njena vloga pri morebitnem prenosu ostala neraziskana.

Primer je izjemno zanimiv iz vsaj dveh razlogov in sicer zaradi prve izolacije MRSA pri govedu v Sloveniji in zaradi prve izolacije seva z genom za odpornost *mecC*.

5. ZAKLJUČKI

Na podlagi rezultatov naše raziskave menimo, da so možnosti za prenos odpornih bakterij prisotne na veliko mestih v času reje, transporta in klavnice, obstajajo pa določene razlike glede verjetnosti prenosa posameznih vrst odpornih bakterij.

Stanje glede prisotnosti proti meticilinu odpornih bakterij *S. aureus*, MRSA

Reja prašičev in klavnica za rdeče meso: V reji prašičev smo preiskovali 11 različnih skupin vzorcev, bakterije MRSA pa smo ugotovili praktično povsod: v nastilu, vodi iz napajalnika, zraku, prezračevalnikih, opremi (škornji, kljuke), okenskih policah, nosnih brisih, brisih boksov. Edini vzorci brez MRSA so bili vzorci krme iz krmilnikov, par je lahko tudi posledica prisotnosti konzervansov.

Podobno kot na prašičji farmi, smo MRSA ugotovili tudi na transportnem kamionu (bris ograje v višini nosa) in na klavnici v vseh nosnih brisih zaklanih prašičev, na brisih trupov po omamljanju in na brisih trupov pred hlajenjem. Vsi izolati MRSA so bili testirani glede odpornosti proti antibiotikom. Pri vseh je bil ugotovljen rezistotip, za katerega je značilna odpornost proti cefoksitinu (indikatorski antibiotik za ugotavljanje odpornosti proti meticilinu), penicilinu in vsem ostalim betalaktamskim antibiotikom, proti kloramfenikolu in proti tetraciklinu. Slednji je indikatorski antibiotik za LA-MRSA, kar nakazuje na izvor okužbe.

Izolati so bili tipizirani z metodo spa in so pripadali tipu spa t011, ki je tudi značilen za LA MRSA in še dodatno pojasnjuje rezultate fenotipskega vzorca odpornosti.

Reja puranov in klavnica za perutnino: V reji puranov je bilo odvzeto 11 skupin različnih brisov okolja in MRSA ni bil ugotovljen v nobenem primeru. Prav tako ni bil izoliran iz nobene od 11 skupin vzorcev živali ali okolja oz. opreme na perutninski klavnici, kjer je bil opravljen zakol puranov z omenjene farne.

Klavnica za perutnino po zaporednem klanju kokoši iz treh različnih rej: Zanimivo pa je, da je bil MRSA izoliran na perutninski klavnici, kjer so bile zaporedno klane kokoši iz treh različnih rej kokoši. Mesto izolacije je bila voda iz skubilnika, odvzeta po koncu skubljenja. Izolat je imel podoben rezistotip, z značilno odpornostjo proti tetraciklinu, ki je tudi nakazoval na LA-MRSA. Kasneje je bil potrjen spa tip t011. Rezultati so prikazani v zbirni tabeli.

Reja govedi in klavnica za rdeče meso: Na posestvu z mešano populacijo živali (govedo, konji, koze, prašiči, perutnina) je bil MRSA ugotovljen pri govedu in svinjah. Med transportom in klanjem telet je bil MRSA ugotovljen v nosnih brisih telet. Rezistotip izolata je potrdil odpornost proti tetraciklinu, kar spet nakazuje na živalski izvor LA-MRSA. Ker smo pri svinjah ugotovili izolat, ki je imel rezistenčni gen *mecC*, nismo mogli potrditi medsebojne povezave.

Stanje glede prisotnosti enterokokov, VRE/HLAR

Enterokoki so bili izolirani iz večine vseh vzorcev, ne glede na živalsko vrsto ali mesto vzorčenja. Glede odpornosti proti vankomicinu je situacija zelo dobra, ker smo odporne seve izolirali samo iz dveh vzorcev vode v parilniku na perutninski klavnici, kjer je šlo očitno za klavniško kontaminacijo. Oba izolata sta bila odporna proti vankomicinu in teikoplaninu zaradi rezistenčnega gena *vanA*. Ta vrsta odpornosti se večinoma prenaša s konjugacijo.

Med ostalimi enterokoki so bili povsod izolirani *E. hirae*, *E. faecium* in *E. faecalis*, ki kažejo različno stopnjo odpornosti proti antibiotikom. Glede na to, da sta *E. faecium* in *E. faecalis* lahko v določenih okoliščinah patogena tudi za ljudi, je spremljanje odpornosti proti drugim antibiotikom prav tako pomembno.

Rezultati glede prisotnosti *E. coli* z razširjenim spektrom beta laktamaz, ESBL/AmpC

Reja puranov in klavnica za perutnino: V reji puranov je bil *E. coli* ESBL ugotovljen le v hlevskem prahu na ventilatorjih in okenskih policah, vsi ostali vzorci pa so bili negativni. V obeh primerih je bil ugotovljen *E. coli* ESBL. Oba izolata sta imela identičen rezistotip, ki je bil fenotipsko zelo odporen še proti drugim skupinam antibiotikov, proti trimetoprimu in kombinaciji trimetoprim/ sulfametoksazola, tetraciklinu in fluorokinolonom. Ohranjena pa je bila dobra občutljivost za karbapeneme, kloramfenikol, gentamicin in kolistin. Na podlagi molekularnih metod je bilo dokazano, da pripadata tipu CTX-M1.

Na klavnici je bilo pregledanih še 10 skupin vzorcev in odporni sevi *E. coli* so bili izolirani iz brisov kletk s purani, vsebine črevesa puranov in iz brisov trupov pred hlajenjem. Vsi ostali vzorci so bili negativni. Vsi izolati so imeli identičen rezistotip, ki je bil fenotipsko zelo odporen še proti tetraciklinom in kinolonom. Na podlagi rezistotipa in rezultatov molekularnih metod je bilo dokazano, da pripadajo *E. coli* AmpC, kar pomeni, da pripadajo drugačnemu tipu kot tista dva, ki smo ju izolirali na farmi.

Klavnica za perutnino po zaporednem klanju brojlerjev iz treh različnih rej: Na *E. coli* z ESBL/AmpC je bilo pregledanih 19 skupin vzorcev. Vzorci prve farme pred zakolom so bili edini negativni na ESBL/AmpC, vsi naslednji vzorci pa pozitivni. Iz vzorcev farm B in C, ki smo jih vzeli na mestu za zakol in skubljenje, smo izolirali *E. coli* ESBL. Vzorci vseh treh farm so bili pozitivni na liniji klanja po evisceraciji, trupi pred hlajenjem in trupi po hlajenju. Vsi izolati so imeli identičen rezistotip in molekularno so pripadali tipu *E. coli* AmpC. Glede na to, da smo dobili na identičnih mestih vzorčenja podobne tipe *E. coli*, bi lahko sklepali, da je šlo za kontaminacijo na klavni liniji.

Reja prašičev in klavnica za rdeče meso: V reji prašičev smo na *E. coli* ESBL/ApC preiskovali vzorce iz 11 različnih skupin in *E. coli* ESBL smo izolirali iz večine vzorcev – nastila, vode iz napajalnikov, krme iz krmilnikov, opreme, škornjev in kljuke, okenskih polic in brisov boksov, vzeti v višini rilcev. Vsi izolati so imeli identičen rezistotip, ki je bil fenotipsko zelo odporen še proti drugim skupinam antibiotikov, proti trimetoprimu in kombinaciji trimetoprim/sulfametoksazola, fluorokinolonom in kloramfenikolu. Ohranjena pa je bila dobra občutljivost za karbapeneme, tetracikline, gentamicin in kolistin. Na klavnici smo *E. coli* ESBL izolirali iz večine vzorcev – brisov s tal kamiona in brisov kamionske ograje v višini nosa, iz nosnih brisov prašičev, umazane bazenske voda, in črevesne vsebine. Odpornih izolatov *E. coli* pa nismo našli na brisih trupov prašičev po omamljanju in ne na brisih nožev po evisceraciji ali brisih nožev veterinarjev. Prav tako so bili negativni vsi brisi trupov prašičev pred hlajenjem. Na posestvu z mešano populacijo živali *E. coli* z ESBL AmpC ni bil ugotovljen.

Rezultati glede prisotnosti *E. coli* z odpornostjo proti karbapenemom

Vsi vzorci so bili preiskani z zelo občutljivo selektivno metodo za izolacijo *E. coli* z odpornostjo proti karbapenemom, vendar so bili rezultati vseh preiskav negativni. Odpornosti proti

karbapenemom nismo ugotovili niti pri izolatih *E. coli*, ki smo jih izolirali na drugih gojiščih in jih fenotipsko testirali na plošči EUVSEC2, ki ima v naboru tudi karbapeneme. Na podlagi rezultatov sklepamo, da izolati *E. coli* z odpornostjo proti karbapenemov še niso zašli med farmsko gojene živali in živila živalskega izvora.

Rezultati glede prisotnosti *E. coli* z odpornostjo proti kolistinu

Vzorci so bili preiskani na komercialnem selektivnem gojišču za izolacijo *E. coli* z odpornostjo proti kolistinu, vendar so bili rezultati vseh preiskav negativni. Iz treh klavniških vzorcev živali iz zadnjega (živalsko mešanega) posestva smo na selektivnem gojišču sicer izolirali kolonije *E. coli*, vendar smo po nadaljnjem fenotipskem testiranju ugotovili, da imajo zelo nizke minimalne inhibitorne koncentracije (manjše kot 1 µg/ml). Rast kolonij se je verjetno pojavila zaradi slabe obstojnosti kolistina v gojišču.

Odpornosti proti kolistinu nismo ugotovili niti pri izolatih *E. coli*, ki smo jih v osnovi izolirali na gojišču za ESBL/AmpC in jih fenotipsko testirali na plošči EUVSEC, ki ima v naboru tudi kolistin.

OPREDELITEV KRITIČNIH MEST

Pri izvajanju posameznih nalog smo bili pozorni na posamezna kritična mesta, kjer bi lahko prišlo do prenosa odpornih bakterij. Klavnica je odobreni živilski obrat, ki mora imeti vzpostavljen sistem HACCP. Določena so splošna pravila higiene živil za nosilce živilske dejavnosti. Ta morajo biti upoštevana, zlasti načela smernice za dobro higiensko prakso, ki so pomemben instrument in nosilec živilske dejavnosti na vseh ravneh živilske verige pomaga, da spoštujejo pravila higiene živil. Nosilec živilske dejavnosti mora prepoznati kritične točke znotraj obrata, kjer bi lahko vstopale bakterije, tudi patogene, v prehransko verigo.

Konkretni pričakovani rezultati so sledeči:

1. Kritična mesta, kjer odporne bakterije vstopajo v prehransko verigo, kontaminacija v različnih fazah klanja oz. predelave, kontaminacija v različnih fazah distribucije in prodaje

Znotraj klavnice sta kritični kontrolni točki vhod surovin (žive živali) in izhod surovine (mesa). Na klavni liniji pa so tudi kontrolne točke na katerih lahko pride do navzkrižne kontaminacije. Med te točke spada prehod nečistega dela v čisti del (operjanje, garanje oz. slačenje kože) in evisceracija (odstranitev nečistega dela). Dodatno tveganje lahko predstavlja rokovanje delavcev z živali in končno čiščenje trupov pred hlajenjem, če pri tem niso upoštevani osnovni higienski pogoji.

Predvidevali smo, da bodo prva kritična točka živali, ki pridejo na klavnico iz rej z zelo različno bakterijsko mikrobioto. Vrste bakterij in njihova odpornost proti antibiotikom so med drugim odvisne od same živalske vrste in njihovega primarnega izvora, načina reje, zdravja živali, epidemiološke situacije, morebitne uporabe antibiotikov v času reje (vrste antibiotikov in dolžine trajanja zdravljenja), vestnosti rejca in številnih drugih dejavnikov. Živali, ki so prihajale na klavnice so imele različno bakterijsko mikrobioto, katero smo predhodno preverili vzorčenjem na sami farmi, tik pred predvidenim klanjem. Vrsta bakterij in njihova odpornost proti antibiotikom se je razlikovala glede na samo živalsko vrsto in njihov izvor, način reje, zdravja živali in posledično morebitne uporabe antibiotikov v času reje.

Z našimi rezultati smo potrdili tako točko na mestu odstranjevanja prebavnega trakta z vsebino. Pri puranih smo iz črevesne vsebine izolirali bakterijo *E. coli* AmpC, enako bakterijo smo izolirali na nožu za evisceracijo in trupu puranov pred hlajenjem. Izsledki kažejo, da kljub uporabi mehaničnega noža za odstranjevanje prebavnega trakta in sprotnemu pranju, ostaja možnost kontaminacije trupov s črevesno vsebino.

Na klavnicah, kjer isti dan koljejo živali različnih vrst (brez vmesnega temeljitega čiščenja in razkuževanja) lahko pride do prenosa odpornih bakterij, ki so značilne za določeno živalsko vrsto (npr. prenos MRSA po klanju prašičev na meso govedi, ki se kolje za njimi). Preverili smo tudi možnost kontaminacije mesa preko delavca, ki najprej sodeluje pri zakolu in nato pri obdelavi mesa.

V klavnici za rdeče meso smo na nožu delavca, ki vrši evisceracijo izolirali bakterijo *Pseudomonas aeruginosa*, ki sicer ni bila predmet naše preiskave, a je primarno zelo odporna proti antibiotikom in dobro preživi v naravnem okolju. Mesarji imajo po Uredbi 853/2004 na vsakem delovnem mestu sterilizator z vročo vodo (minimalno 81 °C), ki naj bi ga uporabili po vsaki uporabi noža. Temperaturo sterilizatorja preverjajo Uradni veterinarji pred začetkom klanja, kvaliteto vode pa preverja nosilec živilske dejavnosti sam. Naši rezultati nakazujejo možnost, da v sterilizatorju ni bilo vode z ustrezno temperaturo saj bi ta preprečevala rast bakterije *Pseudomonas aeruginosa* in posledično tudi drugih bakterij. Rezultati pa so pokazali tudi dobre strani. V klavnici za prašiče smo v umazani bazenski vodi za garanje prašičev izolirali *E. coli* ESBL, brisi trupov pa so bili negativni. V preiskovani klavnici so namreč uporabljali vertikalno metod garanja, kjer se umazana voda izteka v odpadno vodo in se naslednji prašiči ne garajo z isto vodo kot je to pri horizontalni metodi. Pričakovali smo, da bomo v vseh skupinah živali izolirali proti meticilinu odporne stafilokoke, podobno kot s svojimi študijami že dokazujejo razvite evropske države, med njimi tudi Slovenija. V naši študiji smo proti meticilinu odporne stafilokoke izolirali predvsem pri prašičih, izjemoma tudi pri teletih in kokoših, vzorci odvzeti pri puranih pa so bili negativni.

2. Tipizacija izoliranih sevov in proučitev, ali so živalski sevi bakterij že prisotni v populaciji ljudi v Sloveniji in na kakšen način prihaja do morebitnih okužb.

V Sloveniji trenutno tipizacija odpornih bakterij ni del rutinskega diagnostičnega postopka (ne v humani in ne v veterinarski medicini), ker so preiskave zelo drage in nimajo neposrednega pomena za zdravljenje ljudi in živali. Izvajajo se samo v primerih izbruhov, ko je potrebno epidemiološko sledenje in ugotavljanje vira okužb.

Na podlagi podatkov iz prejšnjih raziskav so odporni sevi bakterij, ki jih sicer pogosteje najdemo pri živalih, zanesljivo že prisotni v populaciji ljudi, vendar še ne vemo natančno, kako je do tega prišlo. Največ podatkov imamo na voljo o človeških izolatih LA-MRSA, ki pripadajo istim tipom, kot smo jih doslej ugotovili tudi v populacijah prašičev. Največji delež LA-MRSA je med prebivalci SV Slovenije, kjer je tudi populacija prašičev največja. Možnost prenosa je lahko z neposrednim kontaktom človeka s prašičem, lahko pa tudi s hlevskim prahom in opremo. Poleg tega je znano, da je močno kontaminirano tudi okolje v neposredni bližini prašičjih farm, kar lahko ogroža tudi zdravje okoliških prebivalcev in ne le rejcev.

Zanimiv pa je bil rezultat preiskave krme, ki je bil negativen na prisotnost MRSA, čeprav so bili vsi ostali vzorci na farmi pozitivni. Možno je, da so bila v krmila dodana zelišča, ki imajo lahko naravne protimikrobne lastnosti. Številne študije po svetu namreč kažejo, da zelišča zavirajo rast nekaterih bakterij.

Zelo malo je znanega o prenosu MRSA s svinjskim mesom, posebej še, če potrošniki upoštevajo pravila dobre higienske prakse. Opravljene pa so bile preliminarne študije o nevarnosti prenosa MRSA na delavce v klavnici. Ugotovljeno je, da večja nevarnost za delavce, ki delajo z živimi živalmi in v začetnih fazah klanja, medtem ko je pri kasnejši obdelavi mesa ta nevarnost manjša. V naši raziskavi smo preverili, ali to velja tudi za naš sistem klanja. Za prenos izolatov MRSA iz prašiča na človeka, smo odvzeli nosne brise naših vzorčevalcev. Vsi rezultati so bili negativni, verjetno zato, ker je za kolonizacijo potrebno dalj časa kot dve uri kolikor sta bila naša vzorčevalca v stiku s prašiči.

Vzorci prašičev v začetni fazi klanja so bili pozitivni na prisotnost izolatov MRSA, kasneje smo izolate MRSA izolirali iz brisov trupa pred hlajenjem. Take rezultate pripisujemo naknadni kontaminaciji. Trupi prašičev se po obdelavi prežagajo na polovico. Žaga potuje tudi preko nosnih pretinov rilca in se tako kontaminira z bakterijami MRSA. Kasneje pa se trupi, ko potujejo po liniji, med seboj dotikajo, tako z zunanje kot tudi notranje strani. Druga možnost pa je, da temperatura vode za garanje trupov ne uniči vseh bakterij MRSA.

3. Proučevanje ali je kontaminirana hrana lahko nosilec širjenja črevesnih in zunaj-črevesnih okužb pri ljudeh.

Pregledali smo vzorce mesa prašičev (klavne polovice) in brojlerjev (cele trupe) v končni fazi, ko so že pripravljeni za prodajo oz. za neposredno prehrano ljudi. Po pričakovanjih smo *E. coli* ESBL/AmpC dokazali na trupih brojlerjev in MRSA na klavnih polovicah prašičev.

Podatki o vlogi živali, kot neposrednemu viru okužb z odpornimi enterobakterijami, so zaenkrat še mnogo manj zanesljivi, kot podatki o prenosu MRSA. Tudi v primeru *E. coli* imamo v Sloveniji večji delež prebivalcev, ki so bolniki ali nosilci *E. coli* ESBL/AmpC, vendar neposredni prenos doslej še ni bil zanesljivo dokazan.

4. Molekularna tipizacija večkratno odpornih enterobakterij (predvsem tipa ESBL/AmpC) oz. ugotavljanje njihovih genov za odpornost in patogenost.

V našem projektu smo z molekularnimi metodami izolirali gene za encime ESBL iz skupine CTX-M1 in CTX-M2, AmpC in encime BSBL iz skupine TEM. Tako smo pri puranih, prašičih in teletih izolirali gene za encime iz skupine CTX-M1, pri brojlerjih pa iz skupine CTX-M2. Po literaturi so gene za encime iz skupine CTX-M2 že izolirali iz slovenskih brojlerjev (Ambrožič Avguštin in sod., 2012). *E. coli* AmpC smo izolirali samo pri perutni, in sicer v višjem odstotku pri brojlerjih kot puranih. Vsi izolati *E. coli* AmpC pa so bili iz vzorcev, odvzetih na klavnici, kar nakazuje, da izolati AmpC krožijo v klavnicah za perutnino in to okolje predstavlja tveganje za prenos odpornih sevov na hrano. Gen za encim iz skupine TEM smo izolirali pri vseh ESBL pozitivnih vzorcih pri prašičih na klavnici in v višjem odstotku tudi pri brojlerjih. Gen TEM ne spada med encime ESBL in je odgovoren za odpornost proti ampicilinu. Rezultati kažejo, da se pri prašičih in teletih pogosteje pojavlja gen iz skupine ESBL, ki je najbolj prevalentna, tako v Sloveniji kot po svetu. Brojlerji pa imajo najverjetneje zaradi sistema reje, bolj pogosto gen iz skupine CTX-M2.

Tipizacija odpornih bakterij je povezana z zelo velikimi materialnimi stroški, zato še ni del rutinskega diagnostičnega postopka. Za analizo stanja odpornosti ni zadostno le spremljanje fenotipskih značilnosti izolatov, kar nam omogoča izdelava antibiograma po mikrodilucijski metodi. Zelo različni geni za odpornost lahko namreč določajo enak fenotip, zato je potrebna analiza genotipa oziroma molekularno spremljanje genov za odpornost. Če

vemo, kateri geni so prisotni, na katerih mobilnih elementih so in s tem, kakšne so možnosti za prenos na bakterije drugih vrst in rodov, si lahko razložimo dogajanja na nivoju fenotipov v preteklosti in dodamo napovedi za prihodnost. S pomočjo molekularnih metod smo pripomogli tudi k razumevanju prevalence in mehanizmov odpornosti bakterij proti izbranim protimikrobnim snovem. Na osnovi tega smo lahko ovrednotili tveganje za razvoj navzkrižne odpornosti proti različnim protimikrobnim zdravilom in tudi drugim, nesorodnim protimikrobnim snovem.

Pojav odpornosti proti betalaktamskim antibiotikom so odkrili še pred začetkom klinične uporabe prvega betalaktamskega antibiotika penicilina (Bradford, 2001). Leta 1963 je bila prvič izolirana proti ampicilinu odporna *E. coli*, odpornost ji je omogočil encim betalaktamaza TEM-1, ki je kodiran na plazmidu. Tako se je odpornost razširila v številne vrste družine *Enterobacteriaceae* in nekatere druge bakterije. Produkcija betalaktamaz tipa AmpC pa ni samo plazmidno kodirana, ampak je lahko posledica kromosomske hiperprodukcije zaradi mutacije v promotorski/supresorski regiji.

Encimi iz skupine CTX-M pa predstavljajo v številnih državah najpogostejši vzrok odpornosti enterobakterij proti cefalosporinom. Primarni gostitelj je bakterija vrste *E. coli* (Woodford, 2010). V Sloveniji iz živil živalskega izvora najpogosteje izoliramo CTX-M1, v nižjem odstotku tudi CTX-M2 in CTX-M9 (Ambrožič Avguštin in sod., 2012; Križman in sod., 2017).

5. Ugotavljanje morebitne prisotnosti enterobakterij, ki izločajo karbapenemaze in njihova molekularna tipizacija.

Kljub zelo velikemu številu pregledanih vzorcev, nismo v nobenem primeru ugotovili prisotnosti bakterij *E. coli* s sposobnostjo izločanja karbapenemaz. Vsi vzorci so bili pregledani z usmerjeno bakteriološko preiskavo po protokolu EURL za AMR, ki se uporablja za bolj zanesljivo izolacijo odpornih sevov. Metoda ima visoko občutljivost in ob pravilni izvedbi skoraj ne dopušča napake. Na specialnih gojiščih smo izolirali le posamezne druge odporne bakterije, predvsem *Aeromonas veronii* in bakterije iz rodov *Stenotrophomonas*, *Pseudomonas* in *Acinetobacter*, ki pa imajo običajno drugačen mehanizem odpornosti in so že primarno odporni proti karbapenemu (predvsem ertapenemu).

Dejstvo, da v naši raziskavi nismo uspeli izolirati seva *E. coli*, ki izloča karbapenemaze, je spodbudno in kaže na dobro stanje na tem področju v populaciji slovenskih rejnih živali. Zaradi odsotnosti izolatov molekularna tipizacija ni bila mogoča, vendar pa smo v okviru projekta vzpostavili sistem molekularne tipizacije proti karbapenemu odpornih enterobakterij. V primeru, da bi izolirali take bakterije bi izolat molekularno tipizirali in primerjali z izolati ljudi.

Enterobakterije, ki izločajo karbapenemaze, predstavljajo hud problem v humani medicini, kjer karbapenemi predstavljajo zelo pomembno skupino rezervnih antibiotikov. Ker se v veterinarski medicini ne uporabljajo niti za zdravljenje ljubiteljskih vrst živali, še manj pa za zdravljenje rejnih živali, je prisotnost odpornih izolatov zelo majhna. V Sloveniji že nekaj let izvajamo monitoring na različnih vzorcih živali (tudi na mesu) in doslej še nismo izolirali seva *E. coli*, ki bi izločal karbapenemaze.

6. Priprava sheme za redni monitoring ugotavljanja večkratno odpornih bakterij pri živalih in v živilih ter uvedbo vseh potrebnih metod za molekularno tipizacijo.

Diagnostični protokoli, ki so bili uporabljeni za preiskave vzorcev v okviru našega projekta so sodobni in popolnoma usklajeni z evropskimi, zato je na tem področju stvar popolnoma

urejena. Uvedene metode pa se izjemno hitro dopolnjujejo in modernizirajo, zato je potrebno stalno slediti novim trendom. Osnova za ugotavljanje odpornih bakterij so usmerjene izolacijske metode za posamezne vrste bakterij, za fenotipsko potrditev pa še vedno mikrodilucijska metoda, ki je natančna in informativna, poleg tega pa je tudi priporočena s strani centralnih referenčnih laboratorijev.

V primerih izbruhov ali ugotavljanja vira okužb (predvsem kadar bo utemeljen sum, da je vir okužbe hrana) pa bodo molekularne tipizacijske metode nepogrešljive.

Zaradi potrebnih specialnih znanj in zelo drage opreme pričakujemo, da bo molekularna diagnostika za tipizacijo posebno odpornih bakterij (vključno z geni za MRSA, VRE, ESBL/AmpC, karbapenemaze in drugih genov za odpornost) ostala omejena le na specializirane laboratorije, predvsem na Nacionalni referenčni laboratorij za odpornost proti protimikrobnim zdravilom. Poenotenje metodologije bo omogočilo popolno primerljivost rezultatov, tako znotraj Slovenije kot tudi z državami EU.

V tesni povezavi z izvajanjem projekta sta se zaključila dva doktorata. Avtorica prvega je dr. Manja Križman, ki je v delu z naslovom Razširjenost in genotipizacija sevov *E. coli* z odpornostjo proti betalaktamskim antibiotikom in fluorokinolonom v živilih živalskega izvora (2017) uvedla molekularne metode za določanje genov za odpornost proti penicilinom in cefalosporinom.

Avtorica drugega je dr. Jasna Mičunovič, ki se je v svojem delu z naslovom Genotipi in rezistotipi bakterije *Salmonella Typhimurium* v Sloveniji v obdobju 2000 do 2012 (2018) prav tako ukvarjala s problematiko odpornosti enterobakterij.

7. Priprava podlag za smernice za omejevanje širjenja večkratno odpornih bakterij preko živil živalskega izvora in njihova predstavitev za zainteresirano javnost

V naši raziskavi smo izolirali različne bakterije z odpornostjo proti protimikrobnim zdravilom. Ugotovili smo, da so različne živalske vrste imele odporne bakterije iz različnih skupin, zato bo pri pripravi smernic potreben različen pristop. Za perutnino in perutninske klavnice so bolj prevalentne bakterije z encimi ESBL/AmpC, medtem ko so pri prašičih bolj prevalentni izolati MRSA. V obeh primerih so rezultati dobra podlaga za smernice za nosilce živilske dejavnosti (klavnice) in jih podučili o prisotnosti odpornih bakterij v proizvodnji. V raziskavi smo dobili podatke, katera so tista kritična mesta, kjer lahko bakterija prehaja iz živali na meso. Taka kritična točka je evisceracija, ker smo enak rezistotip bakterij izolirali iz črevesja in brisov trupov pred hlajenjem. Našli smo tudi kritična mesta, ki so že sedaj podvržena kontroli, tako s strani uradnih veterinarjev kot tudi samih nosilcev živilske dejavnosti, pa smo prav tako izolirali bakterije, ki so odgovorne za kvarjenje mesa. Brisi so bili odvzeti med delovnim procesom, a so bili v istem času odvzeti tudi brisi nožev uradnega veterinarja in so bili negativni. V naši raziskavi pa smo dokazali, da so nekateri tehnološki postopki boljši od drugih in lahko damo smernice za gradnjo novih klavnic v prihodnosti.

LITERATURA

- Abraham JL, Morris DO, Griffeth GC et al. Surveillance of healthy cat and cats with inflammatory skin disease for colonisation of the skin by methicillin-resistant coagulase-positive staphylococci and *Staphylococcus schleiferi* subsp. *schleiferi*. *Vet Dermatol* 2007; 18: 252-9.
- Amabile-Cuevas C. F. (editor) 2007. Antimicrobial resistance in bacteria. Horizon Bioscience. Norfolk.
- Ambrožič J, Keber R, Žerjavič K, Oražem T, Grabnar M. Emergence of the quinolone resistance-mediating gene *aac(6')-Ib-cr* in extended-spectrum-beta-lactamase *Klebsiella* isolates collected in Slovenia between 2000 and 2005. *Antimicrob Agents Chemother* 2007, 11 (51): 4171-3.
- Analyses of baseline survey on the prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in holdings with breeding pigs, in the EU, 2008, Part A: MRSA prevalence estimates; on request from the European Commission EFSA Journal 2009; 7(11): 1376, (82 pp).
- Barlow M., Reik R A., Jacobs SD, Medina M, Meyer M P, McGowan JE Jr., Tenover F C. High Rate of mobilization for *bla*CTX-Ms. *Emerg Infect Dis* 2008; 14: 423-8-
- Baquero F., Nombela C., Cassel G. H., Gutierrez J. A. 2008. Evolutionary Biology of Bacterial and Fungal Pathogens. Washington D. C., ASM Press
- Bonnet R. Growing group of extended-spectrum β -lactamases: the CTX-M enzymes. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48: 1-14
- Canton R., Coque T. M. The CTX-M β -lactamase pandemic. *Curr Opin Microbiol* 2006; 9: 457-66.
- Dallenne C, Da Costa A, Decré D, Favier C, Arlet G. Development of a set of multiplex PCR assays for the detection of genes encoding important β -lactamases in Enterobacteriaceae. *Journal Antimicrob Chemother* 2010; 65: 490-5.
- Dierikx, et al., Increased detection of extended spectrum beta-lactamase producing *Salmonella enterica* and *Escherichia coli* isolates from poultry. *Vet. Microbiol.* (2010), doi:10.1016/j.vetmic.2010.03.019
- Devriese L.A., Homes J. 1975. Epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in dairy herds. *Res Vet Sci*, 19: 23-7.
- Hanselman B.A., Kruth S.A., Weese J. Methicillin-resistant staphylococcal colonisation in dogs entering a veterinary hospital. *Vet Microbiol* 2007; 126: 277-81
- Jacoby G. A. Mechanisms of resistance to quinolones. *Clin Infect Dis*, 2005; 41: 120-6.
- Jacoby G. A., Muñoz-Price L. S. 2005. The New β -Lactamases. *New Engl J Med*, 352: 380-391.
- Kocjan B., Seme K., Poljak M. 2004. Genetska osnova odpornosti *Staphylococcus aureus* proti metilicinu. *Med Razgl*, 43: 411-8.
- Kurinčič N, Botteldoorn N, Herman L, Smole Možina S. Mechanisms of erythromycin resistance of *Campylobacter* spp. isolated from food, animals and humans. *Int J Food Microbiol* 2007; 120(1-2): 186-90.
- Lefebvre S.L., Waltner-Toews D., Peregrine A. Et al. Characteristics of programs involving canine visitation of hospitalised people in Ontario. *Infect Control Epidemiol* 2006; 27: 754-8.

- Liu YY et al., Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study. *Lancet Infect Dis*, 2015 doi:10.1016/S1473-3099(15)00424-7.
- Li J., Nation R. L., Turnidge J. D., Milne R. W., Coulthard K., Rayner C. R., Paterson D. L. 2006. Colistin: the re-emerging antibiotic for multidrug-resistant Gram negative bacterial infections. *Lancet Infect Dis*, 9: 589-601
- Livermore D. M. 1995. β -lactamases in laboratory and clinical resistance. *Clin Microbiol Rev*, 8: 557-584
- Livermore D.M. Antibiotic resistance in staphylococci. *Int J Antimicrob Agents* 2000; Suppl 1: S3-10-
- Livermore D. M., 2009. Has the era of untreatable infections arrived? *J Antimicrob Chemother*, 64: (suppl. 1) i29-i36.
- Loeffler A., Boag A.K., Sung J et al.. Prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* among staff and pets in a small animal referral hospital in the UK. *J Antimicrob Chemother* 2005; 56: 692-7.
- Ma J., Zeng Z., Chen Z., Xu X., Wang X., Deng Y., Lü D., Huang L., Zhang Y., Liu J., Wang M. 2009. High prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance determinants *qnr*, *aac(6')-Ib-cr* and *qepA* among ceftiofur-resistant enterobacteriaceae isolates from companion and food-producing animals. *Antimicrob Agents Chemother*, 53:519-24.
- Mammeri H., Van De L. M., Poirel L., Martinez.Martinez L., Nordman P. 2005. Emergence of plasmid-mediated quinolone resistance in *Escherichia coli* in Europe. *Antimicrob Agents Chemother*, 49:71-76-
- Morgan M. 2008. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and animals: zoonosis and humanosis. *J Antimicrob Chemother*, Advance Access published, 1-7.
- Morris D., Rook KS, Shofer FS et al. Screening of *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus intermedius* and *Staphylococcus schleiferi* isolates obtained from small companion animals for antimicrobial resistance: a retrospective review of 749 isolates (2003-4). *Vet Derm* 2006; 5: 332-7.
- Rich M., Roberts L., Kearns A.M. Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* isolates from companion animals. *Vet Microbiol* 2005; 105: 313-4.
- Nordmann P., Poirel L. 2005. Emergence of plasmid-mediated resistance to quinolones in Enterobacteriaceae. *J Antimicrob Chemother*, 56:453-469
- Paterson D. L., Bonomo R. A., 2005. Extended-Spectrum β -Lactamases: a clinical update. *Clin. Microbiol. Rev.* 18: 657-686
- Pérez Pérez FJ, Hanson ND. Detection of Plasmid-Mediated AmpC β -Lactamase Genes in Clinical Isolates by Using Multiplex PCR. *J Clin Microbiol* 2002; 40(suppl. 6): 2153-62.
- Podpečan O. Epidemiološka raziskava okužb mlečne žleze pri kravah molznicah z bakterijo *Staphylococcus aureus* in koagulazno negativnimi stafilokoki. Doktorska disertacija: Veterinarska fakulteta, 2008.
- Poirel L, Walsh TR, Cuvillier V, Nordmann P. Multiplex PCR for detection of acquired carbapenemase genes. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2011; 70 (suppl. 1): 119-23.
- Rodriguez I., Barownick W., Helmuth R., Mendoza M. C., Rodicio M. R., Schroeter A., Guerra B. 2009. Extended-spectrum β -lactamases and AmpC β -lactamases in ceftiofur-resistant *Salmonella enterica* isolates from food and livestock obtained in Germany during 2003-07. *J Antimicrob Chemother*, 64: 301-309.

- Seme K. Stafolokoki. In: Medicinska bakteriologija z imunologijo in mikologijo. 1st ed. Ljubljana: Medicinski razgledi; 2002, p- 139-45.
- Stegger M et al., Rapid detection, differentiation and typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* harbouring either *mecA* or the new *mecA* homologue *mecALGA251*, Clin Microbiol Infect 2012; 18:395-400.
- Van Duijkeren E., Ikawaty R., Broekhuizen-Stins M.J. et al. Transmission of Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains between different kinds of pig farms. Vet Microbiol 2007; 126: 383-9.
- Van Duijkeren E., Jansen M.D., Flemming S.C- et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in pigs with exudative epidermitis. Emerg Infect Dis 2007; 13: 1408-10.
- Walsh T.R., Toleman M.A., Poirel L., Nordmann P. 2005. Metallo- β -Lactamases: the Quiet before the Storm? Clin. Microbiol. Rev. 18:306-325.
- Vankerckhoven V et al. Development of a multiplex PCR for the detection of *asa1*, *gelE*, *cylA*, *esp* and *hyl* genes in Enterococci and survey for virulence determinants among European isolates of *Enterococcus faecium*. J Clin. Microbiol, 2004; 44:73-9.
- Weese JS, Rousseau J, Willey BM et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in horses at a veterinary teaching hospital: frequency characterisation and association with clinical disease. J Vet Intern Med 2006; 20: 182-6.
- Weese JS, Dick H Willey BM et al. Suspected transmission of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* between domestic pets and humans in veterinary clinics and in the household. Vet Microbiol 2006; 115: 148-5-
- Woodford N, Fagan EJ, Ellington MJ. Multiplex PCR for rapid detection of genes encoding CTX-M extended-spectrum β -lactamases. J Antimicrob Chemother 2006; 57(suppl. 1): 154-5.
- Yuan L., Liu J.H., Hu G.Z., Pan Y.S., Liu Z.M., Mo J., Wei Y.J. 2009. Molecular characterization of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* isolates from chickens in Henan Province, China. J Med Microbiol, 58:1449-53.

Objavljeni prispevki raziskovalcev projektne skupine, ki so nastali v neposredni povezavi z raziskovalnim delom na področju odpornosti bakterij

1.01 Izvirni znanstveni članek

- ZORMAN-ROJS, Olga, ZDOVC, Irena, DOVČ, Alenka, ŽGAJNAR, Jaka, SLAVEC, Brigita, KRAPEŽ, Uroš, AMBROŽIČ, Jerneja. Presence and distribution of extended-spectrum and AmpC beta-lactamases-producing *Escherichia coli* on poultry farms in Slovenia. The Journal of Applied Poultry Research, ISSN 1056-6171, 2018, vol. , no. , str. 1-10, doi: 10.3382/japr/pfy021.
- LEDINA, Tijana, MOHAR LORBEG, Petra, GOLOB, Majda, DJORDJEVIC, Jasna, BOGOVIČ MATIJAŠIČ, Bojana, BULAJIČ, Snežana. Tetracycline resistance in lactobacilli isolated from Serbian traditional raw milk cheeses. Journal of Food Science and Technology, ISSN 0022-1155, 2018, vol. 55, no. 4, str. 1426-1434,
- LEDINA, Tijana, GOLOB, Majda, DJORDJEVIC, Jasna, MAGAS, Vladimir, COLOVIC, Svetlana, BULAJIČ, Snežana. MALDI-TOF mass spectrometry for the identification of Serbian artisanal cheeses microbiota. Journal für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit = : Journal of consumer protection and food safety, ISSN 1661-5751. [Print ed.], 2018, vol. 55, no. 4, str. 1426-1434.
- KOKLIČ, Tilen, PINTARIČ, Štefan, ZDOVC, Irena, GOLOB, Majda, UMEK, Polona, MEHLE, Alma, DOBEIC, Martin, ŠTRANCAR, Janez. Photocatalytic disinfection of surfaces with copper doped TiO₂ nanotube coatings illuminated by ceiling mounted fluorescent light. PloS one, ISSN 1932-6203, 2018, vol. 13, no. 5, e0197308, str. 1-17.
- KOKLIČ, Tilen, URBANČIČ, Iztok, ZDOVC, Irena, GOLOB, Majda, UMEK, Polona, ARSOV, Zoran, DRAŽIČ, Goran, PINTARIČ, Štefan, DOBEIC, Martin, ŠTRANCAR, Janez. Surface deposited one-dimensional copper-doped TiO₂ nanomaterials for prevention of health care acquired infections. PloS one, ISSN 1932-6203, 2018, vol. 13, issue 7, str. e0201490 (1-20).
- KRIŽMAN, Manja, AMBROŽIČ, Jerneja, ZDOVC, Irena, GOLOB, Majda, TRKOV, Marija, JAMNIKAR CIGLENEČKI, Urška, BIASIZZO, Majda, KIRBIŠ, Andrej. Antimicrobial resistance and molecular characterization of extended-spectrum B-lactamases and other *Escherichia coli* isolated from food of animal origin and human intestinal isolates. Journal of food protection, ISSN 0362-028X, 2017, vol. 80, no. 1, str. 113-120.
- BANDELI, Petra, GOLOB, Majda, OCEPEK, Matjaž, ZDOVC, Irena, VENGUŠT, Modest. Antimicrobial susceptibility patterns of *Clostridium difficile* isolates from family dairy farms. Zoonoses and public health, ISSN 1863-1959. [Print ed.], 2017, vol. 64, no. 3, str. 213-221.
- DERMOTA, Urška, JURCA, Tomaž, HARLANDER, Tatjana, KOŠIR, Marta, ZAJC, Urška, GOLOB, Majda, ZDOVC, Irena, GRMEK-KOŠNIK, Irena. Infections caused by community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* european clone (ST80) in Slovenia between 2006 and 2013 = Prikaz primerov okužb, povzročenih s proti metilinu odporno bakterijo *Staphylococcus aureus*, domačega okolja, ki pripada evropskemu klonu (ST80) v Sloveniji v obdobju med 2006 in 2013. Zdravstveno varstvo : Slovenian journal of public health, ISSN 0351-0026. [Tiskana izd.], 2016, letn. 55, št. 2, str. 121-125.

1.04 Strokovni članek

- *GOLOB, Majda, ZDOVC, Irena, PATE, Mateja. Odpornost indikatorskih bakterij v školjkah iz slovenskega morja = Antimicrobial resistance of indicator bacteria in mussels from the slovenian sea. Enboz, ISSN 2232-3139, julij-avgust 2018, št. 7, str. 12-18.
- GRILC, Eva, ZDOVC, Irena, JAMNIKAR CIGLENEČKI, Urška. Poročilo srečanja ob Svetovnem dnevu Eno zdravje na NIJZ novembra 2017 = Meeting report on Global One health day in November 2017. Enboz, ISSN 2232-3139, jan. 2018, letn. 8, št. 1, str. 4-6.

- *GOLOB, Majda, PATE, Mateja, ZDOVC, Irena. Enterokoki - vse pogostejši povzročitelji težko ozdravljivih okužb pri živalih. Vestnik Veterinarske zbornice Slovenije, maj 2018, letn. 13, št. 1, str. 22-23.
- TOLAR, Zala, ZDOVC, Irena. Mikrobiološke značilnosti proti meticilinu odpornih sevov *Staphylococcus pseudintermedius* (MRSP) in pomen za živali in ljudi. Ructus, junij 2017, št. 36, str. 19-21.

1.05 Poljudni članek

- PATE, Mateja. Bakterije in antibiotiki : kdo bo koga?. Pogled : oglasna priloga za starše, maj 2018, str. 42-43.

1.08 Objavljeni znanstveni prispevek na konferenci

- KRIŽMAN, Manja, KIRBIŠ, Andrej, JAMNIKAR CIGLENEČKI, Urška. Antimicrobial-resistant bacteria in wild game in Slovenia. V: GINKEL, Leen van (ur.), HENNEKINNE, Jacques-Antoinne (ur.), VELEBIT, Branko (ur.). 59th International Meat Industry Conference MEATCON2017, 1-4 October 2017, Zlatibor, Serbia : Elektronski vir, (IOP conference series. Earth and environmental science (Online), ISSN 1755-1315, Vol. 85). Bristol [etc.]: IOP Publishing. 2017, vol. 85, str. 012083,
- ČIŽMAN, Milan, BEOVIČ, Bojana, ŠTRUMBELJ, Iztok, ZDOVC, Irena, SVETLIN, Anton. Nacionalna strategija o smotni rabi protimikrobnih zdravil v humani medicini = National strategy on prudent use of antimicrobials in human medicine in Slovenia. V: BEOVIČ, Bojana (ur.), LEJKO-ZUPANC, Tatjana (ur.), TOMAŽIČ, Janez (ur.). Infekcijske bolezni extra muros. Ljubljana: Sekcija za protimikrobno zdravljenje SZD. 2016, str. 95-102.

1.09 Objavljeni strokovni prispevek na konferenci

- GOLOB, Majda, GRMEK-KOŠNIK, Irena, DERMOTA, Urška, OCEPEK, Matjaž, ZDOVC, Irena. LA - MRSA se širi v bolnišnice. V: Povzetki predavanj strokovnega izpopolnjevanja sekcije veterinarjev v izobraževanju, raziskovanju, diagnostiki in industriji. [Ljubljana]: Veterinarska zbornica Slovenije, Biotehniški izobraževalni center. 2017, str. [17-18].
- KRIŽMAN, Manja, KIRBIŠ, Andrej, JAMNIKAR CIGLENEČKI, Urška. Bakterije z odpornostjo proti betalaktamskim antibiotikom pri divjadi. V: Povzetki predavanj strokovnega izpopolnjevanja sekcije veterinarjev v izobraževanju, raziskovanju, diagnostiki in industriji. [Ljubljana]: Veterinarska zbornica Slovenije, Biotehniški izobraževalni center. 2017, str. [19-20].
- *GRUNTAR, Igor. MALDI-TOF - tehnologija novih možnosti. V: Povzetki predavanj strokovnega izpopolnjevanja sekcije veterinarjev v izobraževanju, raziskovanju, diagnostiki in industriji. [Ljubljana]: Veterinarska zbornica Slovenije, Biotehniški izobraževalni center. 2017, str. [23-24].
- *ZDOVC, Irena, PIRŠ, Tina, GOLOB, Majda, MIČUNOVIČ, Jasna. Okužba telet z bakterijo *E. coli* z razširjenim spektrom betalaktamaz (ESBL) niso več redkost. V: AMON, Ivan (ur.), SORŠAK, Bernard (ur.). Slovensko bujatrično društvo = Slovenian buiatric association, 27. konferenca slovenskega bujatričnega društva, Terme Dobrna, 7. in 8. april 2017. Maribor: Slovensko bujatrično društvo. 2017, str. 26-28.

1.10 Objavljeni povzetek znanstvenega prispevka na konferenci (vabljen predavanje)

- *OCEPEK, Matjaž. The influence of livestock on human infections with LA-MRSA. V: Proceedings of 8th global summit on microbiology and infectious diseases, February 22 - 23, 2018, Paris, France, Proceedings of 8th global summit on microbiology and infectious diseases, February 22 - 23, 2018,

Paris, France, (Clinical microbiology, ISSN 2327-5073, Vol. 7, 2018). London: Conference Series.2018, vol. 7, str. 32. <https://www.omicsonline.org/conference-proceedings/microbiology-congress-2018-keynote.digital/#4>, doi: 10.4172/2327-5073-C1-032.

- OCEPEK, Matjaž, TOPLAK, Ivan, KUŠAR, Darja. Novejše diagnostične metode v veterinarskem laboratoriju = New diagnostic methods in veterinary laboratories. V: MAJDIČ, Gregor (ur.). 6. Slovenski veterinarski kongres 2016 = 6th Slovenian Veterinary Congress 2016 : Portorož, 2. -3. December 2016, 6. slovenski veterinarski kongres, Portorož, 2. -3. december 2016, (Slovenian veterinary research, ISSN 1580-4003, Vol. 53, suppl. 17, 2016). Ljubljana: Veterinarska fakulteta. 2016, str. 140-141.

1.12 Objavljeni povzetek znanstvenega prispevka na konferenci

- PIRŠ, Tina, OCEPEK, Matjaž, AVBERŠEK, Jana. Antimicrobial resistance of *Clostridium difficile* isolates obtained from two pig farms in longitudinal study. V: RUPNIK, Maja (ur.), JANEŽIČ, Sandra (ur.). Abstract book, 6th International C. Difficile Symposium. Bled, 2018. Maribor: Nacionalni laboratorij za zdravje, okolje in hrano. cop. 2018, str. 130.
- ŠABIČ, Edita, GRUNTAR, Igor, ZORMAN-ROJS, Olga, AMBROŽIČ, Jerneja. Clonal diversity and selected virulent factors of extended-spectrum and AmpC beta-lactamases-producing *Escherichia coli* isolated from poultry farms in Slovenia. V: SKOČAJ, Matej (ur.). Genetika 2018 : book of abstracts, 8th Congress of the Genetics Society of Slovenia [and] 8th Meeting of the Slovenian Society of Human Genetics, September 19-21, 2018. Ljubljana: Slovensko genetsko društvo. 2018, str. 115. <https://repozitorij.uni-lj.si/Dokument.php?id=114563&lang=eng>.
- LOVŠIN, Žana, ZORMAN-ROJS, Olga, ZDOVC, Irena, AMBROŽIČ, Jerneja. Conjugative antibiotic resistance plasmids in *Escherichia coli* isolated from poultry. V: SKOČAJ, Matej (ur.). Genetika 2018 : book of abstracts, 8th Congress of the Genetics Society of Slovenia [and] 8th Meeting of the Slovenian Society of Human Genetics, September 19-21, 2018. Ljubljana: Slovensko genetsko društvo. 2018, str. 145. <https://repozitorij.uni-lj.si/Dokument.php?id=114563&lang=eng>.
- ZORMAN-ROJS, Olga, AMBROŽIČ, Jerneja, ŽGAJNAR, Jaka, DOVČ, Alenka, SLAVEC, Brigita, KRAPEŽ, Uroš, GRUNTAR, Igor, HRISTOV, Hristo. Identification of avian pathogenic *E. coli* based on latent class analysis of virulence associated genes. V: Abstract book, XXth World veterinary poultry association congress, 4th - 8th September, Edinburgh, 2017. Edinburgh: World veterinary poultry association. 2017, str. 184.
- GOLOB, Majda, GRMEK-KOŠNIK, Irena, DERMOTA, Urška, RUPNIK, Maja, PATE, Mateja, AVBERŠEK, Jana, KUŠAR, Darja, ZAJC, Urška, OCEPEK, Matjaž, ZDOVC, Irena. Vloga živali pri okužbah ljudi z LA-MRSA. V: VODOVNIK, Maša (ur.), KUŠAR, Darja (ur.), MARINŠEK-LOGAR, Romana (ur.). Knjiga povzetkov, 7. kongres Slovenskega mikrobiološkega društva, 20.-22. september 2017, Bled, Slovenija. Ljubljana: Slovensko mikrobiološko društvo. 2017, str. 48.
- GOLOB, Majda, KUŠAR, Darja, ZAJC, Urška, AVBERŠEK, Jana, PATE, Mateja, OCEPEK, Matjaž, ZDOVC, Irena. LA-MRSA pri prašičih: dve farmi pod drobnogledom. V: VODOVNIK, Maša (ur.), KUŠAR, Darja (ur.), MARINŠEK-LOGAR, Romana (ur.). Knjiga povzetkov, 7. kongres Slovenskega mikrobiološkega društva, 20.-22. september 2017, Bled, Slovenija. Ljubljana: Slovensko mikrobiološko društvo. 2017, str. 78.
- GOLOB, Majda, GRMEK-KOŠNIK, Irena, DERMOTA, Urška, OCEPEK, Matjaž, ZAJC, Urška, KUŠAR, Darja, PATE, Mateja, AVBERŠEK, Jana, PENGOV, Andrej, ZDOVC, Irena. An example of one health approach to investigate LA-MRSA infections in humans. V: Mikromed 2017, XI Kongres Mikrobiologa Srbije, Beograd, 11-13. maj 2017. [Beograd]: Udruženje mikrobiologa Srbije: Udruženje medicinskih mikrobiologa Srbije. 2017, str. 162.

- GOLOB, Majda, PATE, Mateja, KIRBIŠ, Andrej, ZDOVC, Irena. Odpornost enterokokov v školjkah klapavicah iz slovenskega morja = Antimicrobial resistance of enterococci in mussels in the Slovenian sea. V: MAJDIČ, Gregor (ur.). 6. Slovenski veterinarski kongres 2016 = 6th Slovenian Veterinary Congress 2016 : Portorož, 2. -3. December 2016, 6. slovenski veterinarski kongres, Portorož, 2. -3. december 2016, (Slovenian veterinary research, ISSN 1580-4003, Vol. 53, suppl. 17, 2016). Ljubljana: Veterinarska fakulteta. 2016, str. 189-190.
- *ŠTRUMBELJ, Iztok, KOLMAN, Jana, ZDOVC, Irena, GOLOB, Majda. Odpornost bakterij proti antibiotikom pri ljudeh in živalih - kaj vemo in kaj bi želeli vedeti?. V: KRAIGHER, Alenka (ur.), GRILC, Eva (ur.), ZDOVC, Irena (ur.). Eno zdravje = One health : zbornik izvlečkov. Ljubljana: Nacionalni inštitut za javno zdravje. 2017, str. 40-43.
- *GOLOB, Majda, ZDOVC, Irena, PATE, Mateja, DERMOTA, Urška, RIBIČ, Helena. Kaj imajo skupnega živalski in človeški enterokoki?. V: ZDOVC, Irena (ur.), JAMNIKAR CIGLENEČKI, Urška (ur.), GRILC, Eva (ur.). One health = Eno zdravje : [zbornik povzetkov]. Ljubljana: UL VF. 2017, str. 8

1.16 Samostojni znanstveni sestavek ali poglavje v monografski publikaciji

- KOVAČ, Jasna, ČADEŽ, Neža, STESSL, Beatrix, STINGL, Kerstin, GRUNTAR, Igor, OCEPEK, Matjaž, TRKOV, Marija, WAGNER, Martin, SMOLE MOŽINA, Sonja. High genetic similarity of ciprofloxacin-resistant *Campylobacter jejuni* in central Europe. V: IGREJAS, Gilberto (ur.). Surveying antimicrobial resistance : approaches, issues, and challenges to overcome. [Lausanne]: Frontiers Media SA. 2017, str. 178-183, ilustr. <http://journal.frontiersin.org/researchtopic/3763/surveying-antimicrobial-resistance-approaches-issues-and-challenges-to-overcome>.

MONOGRAFIJE IN DRUGA ZAKLJUČENA DELA

2.08 Doktorska disertacija

- KRIŽMAN, Manja. Razširjenost in genotipizacija sevov *E. coli* z odpornostjo proti betalaktamskim antibiotikom in fluorokinolonom v živilih živalskega izvora : doktorska disertacija = Prevalence and genotyping of *E. coli* strains resistant to beta-lactam antibiotics and fluoroquinolones in food of animal origin : doctoral dissertation. Ljubljana: [M. Križman], 2017. 145 f., ilustr.

IZVEDENA DELA (DOGODKI)

3.15 Prispevek na konferenci brez natisa

- ZDOVC, Irena, GOLOB, Majda. Bakteriološke preiskave urina pri zdravljenju okužb sečil : [predavanje na: Krkin veterinarski dan, 9. 3. 2018, Šmarješke Toplice].
- ZDOVC, Irena, GOLOB, Majda. Odporne bakterije in bolnišnične okužbe v veterinarski medicini : [predavanje na: forumu študentov veterinarstva z naslovom: Odpornost bakterij proti protimikrobnim zdravilom, Ljubljana, 22. 5. 2018].
- *KRIŽMAN, Manja. Klavnični odpadki kot vir bolezni : [predavanje na: KOTO kongres "Odkrito o vlogi kaliferije", KC Brdo pri Kranju, 14. 9. 2017].
- ŠTRUMBELJ, Iztok, KOLMAN, Jana, ZDOVC, Irena, GOLOB, Majda. Odpornost bakterij proti antibiotikom pri ljudeh in živalih - kaj vemo in kaj bi želeli vedeti? : Strokovno posvetovanje ob mednarodnem dnevu Eno zdravje, 3. november 2016, Ljubljana.

Mentor pri doktorskih disertacijah

- MIČUNOVIĆ, Jasna. Genotipi in rezistotipi bakterije *Salmonella typhimurium* v Sloveniji v obdobju 2000 do 2012 : doktorska disertacija = Genotypes and resistotypes of *Salmonella typhimurium* isolates in Slovenia in the period from 2000 to 2012 : doctoral dissertation. Ljubljana: [J. Mićunović], 2018. 136 f., ilustr. (mentor M. Ocepek)
- KRIŽMAN, Manja. Razširjenost in genotipizacija sevov *E. coli* z odpornostjo proti betalaktamskim antibiotikom in fluorokinolonom v živilih živalskega izvora : doktorska disertacija = Prevalence and genotyping of *E. coli* strains resistant to beta-lactam antibiotics and fluoroquinolones in food of animal origin : doctoral dissertation. Ljubljana: [M. Križman], 2017. 145 f., ilustr. (mentor A. Kirbiš, somentor I. Zdovc)

Opomba: prispevki, označeni z * so v neposredni povezavi s projektnim delom, ostali prispevki pa so v tesni povezavi s projektom in odražajo aktivnost članov projektne skupine na področju odpornosti bakterij proti protimikrobnim zdravilom.

SMERNICE ZA OMEJEVANJE ŠIRJENJA VEČKRATNO ODPORNIH BAKTERIJ ŽIVALSKEGA IZVORA

Zdravje rejnih živali lahko bistveno določa varnost proizvodov cele prehranske verige in tako lahko posredno zelo vpliva na zdravje ljudi. Trenutna zakonodaja dobro ureja postopke za preprečevanje širjenja patogenih zoonotičnih bakterij, ni pa še predvidenih smernic za preprečevanje širjenja odpornih in večkratno odpornih bakterij.

Za preprečevanje širjenja je treba poskrbeti v vseh fazah prehranske verige, ki vključuje rejo, transport, vse faze dela na klavnici, transport mesa in izdelkov do trgovin ter vse faze v postopkih skladiščenja in prodaje. Zelo pomembno, a pogosto zanemarjeno, je osveščanje potrošnikov o pravilnem ravnanju z živili pred, med in po njihovi pripravi ter morebitnem hranjenju v hladilniku. Ob upoštevanju vseh splošnih pravil, ki veljajo za dobro gospodinjstvo prakso, se tveganje za kontaminacijo in morebitno kasnejšo okužbo ljudi, lahko zmanjša na minimum.

OPREDELITEV PROBLEMA

Poseben problem predstavljajo bakterije, ki so hkrati odporne proti antibiotikom iz večih različnih farmakoloških skupin (večkratno odporne bakterije, VOB). Med njimi so pomembne tudi bakterije z zelo specifičnimi oblikami odpornosti, predvsem proti meticilinu odporni *Staphylococcus aureus* (MRSA), večkratno odporni *Enterococcus faecalis* in *Enterococcus faecium*, enterobakterije, ki izločajo encime betalaktamaze z razširjenim spektrom delovanja (ESBL) in karbapenemaze, v zadnjem času pa tudi enterobakterije z odpornostjo proti kolistinu. Posebno odporne bakterije izoliramo pri različnih vrstah in kategorijah živali, ki vstopajo v prehransko verigo. V večini primerov je možen prenos teh bakterij z živali na ljudi in obratno, zato jih v strokovni literaturi že omenjajo med povzročitelji zoonoz. Odporne bakterije se lahko pojavljajo pri vseh skupinah in vrstah rejnih živali, vendar pa so znane bakterije, ki se pri določeni živalski vrsti pojavljajo pogosteje. Enaki problemi kot pri živalskih izolatih se posledično pojavljajo tudi pri bakterijah, ki kontaminirajo hrano.

MRSA (proti met icilinu odporni *Staphylococcus aureus*)

Stafilokoki, proti katerim so bili pripravljene prvi antibiotiki, so začeli razvijati mehanizme odpornosti že zelo kmalu po začetku uporabe. Problem je bil začasno rešen, ko so leta 1959 sintetizirali prvi polsintetični penicilin, imenovan met icilin, vendar so se že dve leti kasneje pojavili prvi odporni sevi, ki pa so imeli drugačen mehanizem odpornosti. Ti sevi so bili sposobni sintetizirati posebno obliko penicilin vezoče beljakovine (PBP2), proti kateri antibiotik ni deloval in bakterije so normalno preživele. Sevi MRSA so bili sprva problematični le v humani medicini, kjer so predstavljali najpomembnejše bolnišnične okužbe (HA-MRSA), kasneje pa tudi v prosti populaciji (CA-MRSA). V veterinarski medicini so se prvi izolati MRSA pojavili že v 70. letih, vendar je problematika MRSA dobila mnogo širše razsežnosti leta 2007, ko so na Nizozemskem ugotovili, da so prašiči na številnih farmah kolonizirani s posebnim tipom ST398, ki so ga poimenovali MRSA rejnih živali ali LA-MRSA (livestock associated MRSA). Zaradi prostega pretoka blaga in storitev znotraj EU se je LA-MRSA zelo hitro razširila po vseh državah EU in tudi v Slovenijo.

Odpornost je običajno kodirana s posebnim genom *mecA*, poleg tega pa so znani še nekateri drugi podobni geni, med katerimi je najpomembnejši gen *mecC*, ki je bil prvič opisan leta 2011 v Angliji. Ker se pojavlja tako pri človeških kot tudi pri živalskih izolatih MRSA (predvsem izolati iz mleka goved), je bilo to zelo pomembno odkritje tudi za veterinarsko medicino. Zaradi tega smo v Sloveniji takoj posodobili molekularno diagnostiko MRSA in vpeljali metode za detekcijo obeh genov. Glede na to, da so se v Sloveniji med človeškimi izolati MRSA že pojavili sevi z genom *mecC*, moramo njihovo morebitno prisotnost slediti tudi v populacijah rejnih živali.

ESBL (Enterobakterije z razširjenim spektrom beta laktamaz)

V zadnjem času so posebej izpostavljene različne vrste enterobakterij (v veterinarski medicini predvsem *E. coli*, redkeje salmonеле), ki lahko izločajo različne betalaktamaze. Take izolate uvrščamo v skupino enterobakterij z razširjenim spektrom betalaktamaz (angl. extended specter betalactamase, ESBL). To pa pomeni, da so odporne proti večini betalaktamskih antibiotikov, pogosto pa se pojavi tudi pridružena odpornost proti antibiotikom iz drugih

farmakoloških skupin. Med živalskimi bakterijam ima take mehanizme odpornosti predvsem *E. coli*, ki je lahko patogena in povzroča različne oblike specifičnih bolezenskih stanj, lahko pa je komezalna bakterija, ki predstavlja del normalne črevesne mikrobiote. Ker se geni za odpornost pogosto prenašajo na plazmidih, lahko take odporne bakterije predstavljajo vir genov za druge človeške in živalske bakterije.

Bakterije, odporne proti kinolonom

Velik problem predstavlja tudi naraščanje odpornosti proti kinolonom, pri katerih gre za drug mehanizem rezistence. Poleg tega pa se je pojavila tudi posebna skupina sevov, pri katerih je gen za odpornost proti kinolonom na plazmidu (PMQR, plasmid mediated quinolone resistance). Odpornost proti kinolonom se pojavlja tako pri po Gramu pozitivnih kot tudi pri po Gramu negativnih bakterijah, pogosto pa je pridružena pri izolatih MRSA in ESBL.

Bakterije, odporne proti karbapenemom

Bakterije z odpornostjo proti karbapenemom so v humani medicini med bolj problematičnimi, ker so odporne proti zdravilom iz skupine kritično pomembnih antibiotikov. Ker se karbapenemi v veterinarski medicini ne uporabljajo, je izolacija takih bakterij pri živalih redka. V Sloveniji doslej, kljub rednemu monitoringu, pri živalih še niso bile izolirane, vendar pa so jih ugotovili že v nekaterih drugih državah EU. Zaradi tega je sistematično spremljanje pri živalih in v živilih potrebno nadaljevati.

Bakterije, odporne proti kolistinu

V zadnjem času so veliko pozornosti vzbudili tudi izolati enterobakterij z odpornostjo proti kolistinu, ki se sicer uporablja za zdravljenje črevesnih okužb pri rejnih živali, predvsem perutnine in prašičev. Zaradi pojava bakterij, ki so odporne proti karbapenemom, je namreč v humani medicini postal kolistin rezervni antibiotik (critical important antimicrobials, CIA) za zdravljenje takih okužb. Ker obstaja možnost, da so bakterije zaradi uporabe kolistina za zdravljenje rejnih živali, pridobile gene za odpornost, je stanje glede odpornosti pri živalih

potrebno temeljito in stalno spremljati, tako na področju humane kot tudi veterinarske medicine.

V Sloveniji je kolistin registriran za rejne živali (prašiče in perutnino), vendar se uporablja redko. Uporaba sicer ni prepovedana, vendar je v strokovnih krogih potrebno poudarjati pomen takojšnjega opuščanja.

Odporni *Enterococcus faecalis/faecium*

Enterokoki so pogojno patogeni mikroorganizmi, ki so normalni del črevesne mikrobiote, vendar lahko povzročajo tudi resne okužbe in spadajo med štiri najpogostejše povzročitelje bolnišničnih okužb. Uvrščamo jih sicer med komenzalne bakterije, vendar se v zadnji letih povečuje število težje ozdravljivih enterokoknih okužb pri ljudeh, kar je verjetno tudi ena izmed posledic naraščanja odpornosti proti številnim protimikrobnim zdravilom. Zbolijo predvsem bolniki s kroničnimi ali sistemskimi boleznimi in z oslabljenim imunskim sistemom. Najpogostejši vir okužbe so živali, kontaminirano okolje ali kontaminirana hrana. V humani medicini so v zadnjih desetletjih pomembni predvsem kot večkratno odporni povzročitelji bolnišničnih okužb z VRE (proti vankomicinu odporni enterokoki). Razumevanje transformacije enterokokov iz komenzalnih v patogene bakterije, je ključnega pomena za obvladovanje okužb. Enterokoki tako lahko predstavljajo rezervoar genov za odpornost, ki se preko plazmidov lahko prenesejo na druge, potencialno patogene bakterije. Njihov nivo odpornosti je dober pokazatelj, kako močan je selektivni pritisk na bakterije z uporabo določenega antibiotika ter kakšno odpornost lahko pričakujemo pri patogenih bakterijah. Prisotnost enterokokov v prebavnem traktu živali predstavlja veliko možnost kontaminacije hrane tekom prehranske verige. V okviru skupnega programa FAO in SZO za prehranske standarde so bile določene smernice za analizo tveganja odpornosti proti protimikrobnim snovem, pri bakterijah, ki se prenašajo z živili, kar je bilo prepoznano kot velik svetovni problem na področju javnega zdravja in varnosti živil. Na osnovi tega je EFSA objavila znanstveno poročilo o tehničnih specifikacijah za usklajeno spremljanje in poročanje odpornosti proti protimikrobnim snovem različnih bakterij (*Salmonella* spp., *Campylobacter* spp.), ki se prenašajo z živili. Med pomembne je uvrstila tudi spremljanje odpornosti pri indikatorskih komenzalnih bakterij iz rodu *Enterococcus*.

PRIPOROČILA ZA DIAGNOSTIKO ODPORNIH SEVOV

Odporne bakterije pri rejnih živalih večinoma ugotavljamo v obliki monitoringov v rejah klinično zdravih živali, ki so namenjene za prehrano ljudi. Vzorci se vzamejo različnim zdravim živalim, mesto in število vzorcev pa se določi po posebnem ključu, tudi glede na stalež določene vrste oz. kategorije živali in glede na verjetnosti da so določene odporne bakterije v populaciji prisotne. Odporne izolate večine omenjenih bakterijskih vrst z različnimi oblikami večkratne odpornosti že občasno ali celo pogosto izoliramo tudi iz vzorcev živali, zrejenih v Sloveniji. Zaradi tega ima veterinarska stroka dolžnost, da dobro pozna stanje v domačih rejah in živilskih obratih ter uvede ukrepe za preprečevanje širjenja odpornih bakterij preko živil živalskega izvora.

Odporne bakterije se ugotavljajo tudi pri bolnih živalih, vendar so v smislu prehranske varnosti manj pomembne, ker bolne živali ne smejo biti napotene na redno klanje. V primeru, da bolna žival ni pravočasno prepoznana ali, da se znaki bolezni ugotovijo šele po klanju, pa taka žival lahko pomeni še večjo nevarnost za zdravje ljudi.

Predlog sheme za redni monitoring večkratno odpornih bakterij pri živalih in živilih

Program spremljanja odpornosti bakterij proti protimikrobnim zdravilom je sestavni del Programa monitoringa zoonoz in njihovih povzročiteljev (program zoonoz). Spremljanje odpornosti se izvaja v skladu s Sklepom Komisije (EC) št. 652/2013 o spremljanju in poročanju odpornosti zoonotskih in komenzalnih bakterij proti protimikrobnim zdravilom. Poleg tega so, na nacionalnem nivoju, v spremljanje odpornosti vključeni še določeni izolati bakterij, ki se v skladu z omenjenim sklepom Komisije v spremljanje lahko vključijo prostovoljno, ter določeni izolati bakterij, pri katerih se spremljanje odpornosti in trendov na nivoju Slovenije izvaja že več let.

V spremljanje odpornosti so že vključene številne bakterije iz različnih vrst živali in tudi živil, med drugim tudi enterobakterije z razširjenim spektrom delovanja beta-laktamaz (ESBL/AmpC), sevi *E. coli*, ki proizvajajo karbapenemaze in bakterije iz rodu *Enterococcus*, odporni proti vankomicinu. Za določene, prav tako pomembne bakterije, predvsem proti

meticilinu odporne sevi *Staphylococcus aureus* (MRSA) ali bakterije iz rodu *Enterococcus*, odporni proti visokim koncentracijam aminoglikozidov pa imamo v Sloveniji trenutno na razpolago zelo omejene podatke. Največ je pridobljenih iz različnih raziskovalnih nalog oziroma projektov (npr. projekt CRP V4-1606).

Diagnostične metode za ugotavljanje odpornih bakterij

Metode za izolacijo odpornih bakterij

Odporne bakterije pri rejnih živalih so v primerjavi z občutljivimi sevi praviloma v nizkem deležu in v populacijah, kjer ni antibiotičnega selekcijskega pritiska nimajo nobene prednosti pred občutljivimi bakterijami. Za izolacijo odpornih sevov so nujno potrebne usmerjene preiskave z obogativenimi in selektivnimi gojišči za točno izbrano vrsto bakterije in stopnjo njene odpornosti proti določeni skupini antibiotikov.

Na področju veterinarstva so metode usklajene na ravni Evropske unije, kjer se protokoli pripravljajo in validirajo v okviru delovanja Evropskega referenčnega laboratorija za ugotavljanje odpornosti proti protimikrobnim zdravilom (EU-RL AMR), ki ima sedež v Kopenhagenu na Danskem. Vsaka država članica je dolžna imenovati svoj nacionalni referenčni laboratorij (NRL), ki je zadolžen za implementacijo vseh protokolov na nacionalni ravni. V Sloveniji je za opravljanje te dejavnosti pooblaščen NRL za ugotavljanje odpornosti proti protimikrobnim zdravilom (NRL AMR), ki deluje v okviru Nacionalnega veterinarskega inštituta (NVI) na Veterinarski fakulteti v Ljubljani. NRL opravlja vse analize v okviru mednarodnih in nacionalnih monitoringov pri rejnih živalih.

Poleg usklajenih diagnostičnih protokolov je poenoteno tudi spremljanje in poročanje rezultatov, ki se zbirajo v okviru Evropske agencije za varno hrano (EFSA), kjer se podatki obdelajo. Na podlagi tega se vsako leto izda skupno poročilo, ki je javno dostopno na njihovi uradni spletni strani.

Metode za ugotavljanje odpornosti proti antibiotikom

Fenotipske metode

Bakterije, ki so izolirane na selektivnih (ali na neselektivnih) gojiščih je potrebno testirati glede odpornosti proti različnim antibiotikom iz vseh glavnih farmakoloških skupin. Za fenotipsko testiranje se uporablja mikrodilucijska metoda, ki daje zelo natančne podatke o minimalni inhibitorni koncentraciji (MIK) antibiotika, ki je potreben, da ubije ali zavre rast določene bakterije. V Sloveniji je za to prav tako zadolžen NRL AMR v okviru dejavnosti NVI.

S fenotipskimi metodami se določa občutljivost (S, angl. susceptibility) ali odpornost (R, angl. resistance) bakterije proti določenemu antibiotiku. Vzorec odpornosti posamezne bakterije določa njen rezistotip, ki je za posamezne skupine izolatov lahko značilen, ni pa nujno. Določanje rezistotipa je za tipizacijo in namene epizootiološkega spremljanja manj primerno in služi le kot orientacijski podatek. Zaradi tega in tudi drugih razlogov pa so nujno potrebne molekularne metode.

Molekularne metode

Fenotipsko določanje odpornosti posameznih izolatov je nujno za izbiro najbolj primerne antibiotika za zdravljenje. Določen fenotip lahko kodirajo zelo različni geni za odpornost, kar lahko ugotovimo z molekularnimi metodami, ki nam povedo tudi ali je nek gen zapisan na plazmidu in se bo lahko širil horizontalno (med bakterijami iste ali drugih vrst) ali je zapisan na kromosomu in se bo širil vertikalno (samo na hčerinske bakterije). Za zbiranje epidemioloških podatkov o prisotnosti in širjenju genetskih determinant odpornosti v državi kot tudi v EU uporabljamo tudi genotipizacijske metode kot je npr. sekvenciranje celotnih genomov (angl. whole genome sequencing, WGS). V Sloveniji bi bilo smiselno spremljanje odpornosti proti protimikrobnim zdravilom nadgraditi z molekularnimi metodami, npr. z vključitvijo nekaterih novih bakterij kot so proti meticilinu odporni sevi *Staphylococcus aureus* (MRSA) in enterobakterije z beta-laktamazami razširjenega spektra (ESBL).

PREDLOGI ZA RAZŠIRITEV SPREMLJANJA ODPORNIH BAKTERIJ, KI SE S HRANO LAHKO PRENAŠAJO NA LJUDI

V večini primerov odporni izolati spadajo med zoonotične in komenzalne bakterije, ki so v osnovi za človeka nepatogene, v določenih okoliščinah pa se lahko njihovi geni za odpornost prenesejo na bakterije, ki so patogene za ljudi in/ali živali. Zato je poznavanje stanja glede njihove prisotnosti v živilih pomembno pri načrtovanju smernic za preprečevanje kontaminacije živil samih in njihovega okolja.

Periodično spremljanje MRSA

Spremljanje MRSA je potrebno pri vseh živalih, ki se redijo za proizvodnjo hrane, posebno pomembno pa je poznavanje stanja pri prašičih. V našem projektu, in tudi v temeljni študiji iz leta 2008 se je izkazalo, da je v naših rejah prašičev MRSA stalno prisotna. Na podlagi doslej opravljenih tipzacij je znano, da so na večjih posestvih lahko prisotni različni spa tipi, kar je verjetno posledica stalnega vnosa novih tipov MRSA z uvoženimi živalmi. V naši študiji je bil prvič pri živalih v Sloveniji ugotovljen tip MRSA, pri katerem je odpornost proti metilicinu kodirana z genom *mecC*. Taki sevi MRSA imajo nižjo stopnjo odpornosti proti cefoksitinu in za njihovo izolacijo potrebujemo nekoliko manj selektivna gojišča kot za običajne izolate MRSA. Zato predlagamo izvedbo periodičnega monitoringa:

- po klasičnem protokolu za izolacijo MRSA v skladu s priporočili EURL za ugotavljanje odpornosti bakterij proti protimikrobnim zdravilom in hkrati
- po modificirani metodi (na posebnem, manj selektivnem gojišču) za ugotavljanje izolatov MRSA, ki imajo odpornost kodirano z genom *mecC*

Menimo, da je zaradi razmeroma visokega deleža MRSA z *mecC* pri ljudeh v Sloveniji tak monitoring potrebno izvesti vsaj pri prašičih, na podlagi teh rezultatov pa se kasneje po potrebi lahko vključijo tudi druge živali.

Rezultati naše študije so pokazali, da je periodično spremljanje MRSA pomembno tudi pri drugih živalskih vrstah, kjer MRSA doslej še ni bila ugotovljena. V letu 2018 smo jo ugotovili v čredi govedi (pri teletih) na posestvu z mešano populacijo živali, med katerimi so tudi prašiči. V prvi vrsti je pomembno pregledati krave molznice na posestvih, kjer imajo hkrati tudi rejo prašičev, posebej še, če je bila pri njih že dokazana MRSA.

Zelo malo imamo podatkov o stanju MRSA pri kravah molznicah. Ker vemo, da je *S. aureus* eden najbolj pomembnih povzročiteljev mastitisa pri kravah, bi bilo priporočljivo pregledati tudi vzorce mleka v krav, posebno v rejah, kjer uspehi zdravljenja ne sledijo pričakovanjem.

Periodično ugotavljanje prisotnosti *Enterococcus faecali/faecium* proti aminoglikozidom v visoki koncentraciji (HLAR) in odpornih proti vankomicinu (VRE)

Ena izmed ugotovitev tega projekta je bila tudi, da so praktično vsi vzorci, ki smo jih preiskovali, kontaminirani z enterokoki. Iz večine vzorcev, tako na farmah, kot v klavnicah in v živilih, smo izolirali enterokoke, med katerimi so prevladovalе vrste *E. faecalis*, *E. faecium* in *E. hirae*. Izolirani enterokoki so izkazovali različno stopnjo odpornosti proti različnim antibiotikom, poleg tega pa smo pri vzorcih perutnine izolirali tudi proti vankomicinu odporne enterokoke. V okviru našega projekta so bili tako odporni enterokoki izolirani zelo redko, kljub temu pa je smiselno v določenem časovnem obdobju stanje ponovno preveriti (vsaj vsakih 5 let ali pogosteje, če se za to izkaže potreba). Pravočasno zaznavanje enterokokov iz skupine HLAR je pomembno zaradi dejstva, da so enterokoki zelo pogosto prisotni v različnih vrstah živil živalskega izvora.

Glede na to, da enterokoke uvrščamo med štiri najpogostejše povzročitelje bolnišničnih okužb in glede na zelo veliko pogostnost pojavljanja enterokokov v prehranski verigi, je spremljanje odpornosti enterokokov, ki tudi pri ljudeh povzročajo okužbe, prav tako pomembno. Tudi v znanstvenih poročilih, ki jih objavlja EFSA, je navedeno, da je potrebno tudi za indikatorske komezalne bakterije iz rodu *Enterococcus*, spremljanje odpornosti opravljati dosledno.

Nadgradnja programa spremljanja odpornosti večkratno odpornih bakterij z molekularnimi metodami

Program mora biti sestavljen tako, da smiselno dopolnjuje že obstoječe programe in se lahko prilagaja potrebam v veterinarski in humani medicini. Poleg rednih monitoringov je potrebno sprejeti algoritme za ukrepanje v primerih izbruhov bolezni zaradi okužb z odpornimi bakterijami ali kadar se pojavi pogostejše pojavljanje le teh pri ljudeh in/ali živalih. Izolaciji bakterij in ugotovitvi odpornosti s fenotipskimi metodami mora slediti molekularna diagnostika za dokazovanje genov odpornosti in za preverjanje epidemiološko povezanih izolatov.

Bakterija	Ugotavljanje genov	Kriterij za izbor izolatov
enterobakterije (običajno <i>E. coli</i>)	<i>bla</i> _{TEM} , <i>bla</i> _{SHV} , <i>bla</i> _{CTX-M} , <i>bla</i> _{CYM}	izolati s posebnim vzorcem odpornosti, ki fenotipsko kažejo odpornost ESBL/AmpC
	<i>bla</i> _{BMP} <i>bla</i> _{VIM} <i>bla</i> _{OXA-48} <i>bla</i> _{NDM-1} <i>bla</i> _{KPC}	izolati s posebnim vzorcem odpornosti, ki fenotipsko kažejo odpornost proti karbapenemom
	geni <i>mcr</i>	izolati, ki so fenotipsko odporni proti kolistinu
	WGS	izbruh pri živalih in/ali ljudeh*, epidemiološko povezani izolati
enterokoki (običajno <i>E. faecalis</i> in <i>E. faecium</i>)	<i>vanA</i> <i>vanB</i>	izolati, ki so fenotipsko odporni proti vankomicinu
	WGS	izbruh pri živalih in/ali ljudeh*, epidemiološko povezani izolati
stafilokoki <i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA)	<i>mecA</i> , <i>mecC</i> , <i>pvl</i>	izolati, ki so fenotipsko odporni proti cefoksitinu
	<i>spa</i> tipizacija in/ali WGS	izbruh pri živalih in/ali ljudeh*, epidemiološko povezani izolati

*V primerih suma, da je izbruh pri ljudeh povezan z živalmi, se o izboru izolatov (vrsti in številu) skupaj dogovorijo predstavniki medicinske in veterinarske stroke. Potrebno je imenovati laboratorije, ki so usposobljeni in pooblaščen za izvedbo testiranj ter zagotoviti finančna sredstva.

Smernice za smotrno rabo protimikrobnih zdravil, ki bi lahko vplivala na odpornost tistih bakterij, ki se prenašajo z živali na ljudi

Smernice so pomembne predvsem za tiste vrste odpornih bakterij, ki jih v populacijah rejnih živali v Sloveniji že imamo, torej predvsem MRSA in *E. coli* ESBL. Med domačimi živalmi, ki so namenjene za prehrano ljudi, največji delež živali z večkratno odpornimi bakterijami najdemo predvsem v rejah perutnine, prašičev in govedi. Veliko protimikrobnih zdravil, ki se uporabljajo pri proizvodnji živil rastlinskega in živalskega izvora so enaka ali podobna kot tista, ki se uporabljajo za zdravljenje ljudi. Protimikrobna zdravila za spodbujanje rasti so že od leta 2006 prepovedana, vendar ostaja uporaba za zdravljenje, ki pa je še vedno dovolj visoka, da lahko vodi do selekcije odpornih bakterij, ki so lahko patogene za živali in/ali ljudi. Pri odločanju oz. izbiri primerne antibiotike za zdravljenje živali je potrebno upoštevati nekatera splošna in specialna priporočila.

Pravilna diagnoza bolezni in izbira antibiotika

Klinično diagnozo, ki jo postavi veterinar na podlagi klinične presoje, je potrebno potrditi z mikrobiološko preiskavo, ki vključuje tudi testiranje občutljivosti za protimikrobna zdravila. Antibiotik je potrebno izbrati skladno z doktrino in v naboru, ki je predviden za uporabo v veterinarski medicini. Praviloma izbiramo antibiotike iz farmakoloških razredov, ki niso pomembna za humano medicino. Če takih ni na razpolago oz. so za izolirano bakterijo neučinkoviti, izbiramo tudi v drugih razredih, vendar se je potrebno zavedati stopnje njihove pomembnosti in skladno s tem omejiti njihovo porabo. Protimikrobni razredi, ki se uporabljajo v humani medicini, so glede pomembnosti uvrščeni na poseben seznam, kjer so razvrščeni kot:

- pomembni,
- zelo pomembni in
- kritično pomembni za humano medicino (angl. critical important antimicrobials, CIA).

Slednjih se v veterinarstvu ne uporabljajo, razen za zelo izjemne primere pri malih živalih, kar pa mora biti strokovno upravičeno in dobro dokumentirano. Nikoli pa se ne uporabljajo za zdravljenje rejnih živali.

Smotrna poraba protimikrobnih zdravil

Za preprečevanje pojava odpornosti je potrebno upoštevati nekatera splošna priporočila:

- Splošno zmanjšanje porabe vseh antibiotikov, posebno pa iz tistih farmakoloških razredov, ki so pomembni tudi za zdravljenje ljudi. Pomembno je predvsem zmanjšanje porabe fluorokinolonov in cefalosporinov.
- Opustitev uporabe teh zdravil za rejne živali v preventivne namene oz. za primere, ko bolezen še ni klinično izražena.
- Antibiotiki iz skupine CIA se za rejne živali ne smejo uporabljati v nobenem primeru (niti za bolne živali). Zelo pomembno je opuščanje uporabe kolistina. V humani medicini se sicer dolgo časa skoraj ni uporabljal, vendar je s pojavom proti karbapenemom odpornih bakterij postal zelo pomembno zdravilo zadnjega izbora. V Sloveniji (in tudi drugje v EU) je še vedno registriran za perutnino in prašiče, vendar je uporaba zanemarljiva in glede na odziv veterinarjev predvidevamo, da bo v Sloveniji njegova uporaba opuščena.
- V skupino CIA mora biti uvrščeno vsako novo protimikrobno zdravilo, razen če ni razvito posebej za veterinarske namene.

Smernice za smotno rabo protimikrobnih zdravil, ki bi lahko vplivala na odpornost tistih bakterij, ki se prenašajo z živali na ljudi, se stalno spreminjajo in prilagajajo novim znanstvenim spoznanjem.

ZAKLJUČEK

Najbolj znana in raziskana je naraščajoča odpornost proti protimikrobnim zdravilom, vendar obstaja in celo narašča tudi odpornost mikroorganizmov proti drugim protimikrobnim snovem, kot so npr. razkužila in konzervansi. Slednji so zanesljivo prisotni v živilski industriji, zato ima to lahko zelo pomembne posledice za zagotavljanje varnosti v proizvodni verigi hrane in pri živilskih izdelkih. Zato je ključnega pomena poznavanje pogostosti odpornih sevov, ki so patogeni za ljudi in živali, pa tudi drugih mikroorganizmov vzdolž celotne proizvodne verige. Pomembno je tudi poznavanje mehanizmov in s tem vzrokov odpornosti proti različnim protimikrobnim snovem. Podobni tipi odpornosti se izražajo pri bakterijah človeškega, živalskega in okoljskega izvora in možen je prenos odpornih bakterij ali njihovih genov v vseh fazah prehranske verige.

Vzorci mesa so pogosto bolj kontaminirani kot individualni vzorci živali, kar je lahko posledica naknadne kontaminacije na klavnicah in v trgovinah, zato si moramo prizadevati za izvedbo enotnega in stalnega monitoringa glede prisotnosti večkratno odpornih bakterij v različnih vrstah živil. Pojav večkratno odpornih bakterijskih sevov pri rejnih živalih je sicer pomemben s stališča zdravja živali, še bolj pa je pomemben za zagotavljanje prehranske varnosti oz. ohranjanja zdravja ljudi. Pri rejnih živalih je osebni stik s človekom manj izražen, vendar lahko prihaja do prenosa odpornih bakterij (ali njihovih genov) preko hrane, kar pomeni, da se hkrati lahko kolonizira ali okuži večje število ljudi.